

GYÖRGY ÉVA

ÉLELMISZER- MIKROBIOLÓGIA

LABORATÓRIUMI GYAKORLATOK

GYÖRGY ÉVA

ÉLELMISZER-MIKROBIOLOGIA
LABORATÓRIUMI
GYAKORLATOK



SAPIENTIA ERDÉLYI MAGYAR TUDOMÁNYEGYETEM
CSÍKSZEREDAI KAR
ÉLELMISZER-TUDOMÁNYI TANSZÉK

ÉLELMISZER-MIKROBIOLÓGIA LABORATÓRIUMI GYAKORLATOK

GYÖRGY ÉVA

Scientia Kiadó
Kolozsvár ■ 2020

Felelős kiadó:

Kása Zoltán

Lektor:

Molnos Éva (Csíkszereda)

Laslo Éva (Csíkszereda)

Borítóterv:

Tipotéka Kft.

A szakmai felelősséget teljes mértékben a szerkesztők, illetve a szerzők vállalják.

Első magyar nyelvű kiadás: 2020

© Scientia 2020

Minden jog fenntartva, beleértve a sokszorosítás, a nyilvános előadás, a rádió- és televízióadás, valamint a fordítás jogát, az egyes fejezeteket illetően is.

Descrierea CIP a Bibliotecii Naționale a României

GYÖRGY, ÉVA

Élelmiszer-mikrobiológia laboratóriumi gyakorlatok / György Éva. - Cluj-Napoca :

Scientia, 2020

Conține bibliografie

ISBN 978-606-975-038-4

TARTALOM

Előszó.	17
1. A mikrobiológia laboratóriumban betartandó munkavédelmi rendszabályok	19
2. Mintavétel és előkészítés az élelmiszerek mikrobiológiai vizsgálata során.	21
3. A környezetünkben előforduló mikroorganizmusok kimutatása	23
3.1. A levegőben levő csírák kitenyésztése szedimentációs módszerrel.	24
3.2. Laboratóriumi asztalfelületek, fal, ruházat fertőzőtségének tesztelése	25
3.3. Bőrfelület mikrobás szennyezettségének vizsgálata	26
4. Élelmiszerek szempontjából jelentős baktériumok mikroszkópi vizsgálata	28
4.1. Baktériumok vizsgálata összetett festéssel. Gram-festés.	28
4.2. A baktériumspóra kimutatása Schaeffer–Fulton festési módszerrel	30
5. Élősejtszám-meghatározás tenyésztéses módszerekkel	34
5.1. Határhígításos élősejtszám-meghatározás (MPN-módszer)	35
5.1.1. Fagyasztott zöldség mezofil aerob sejtszámának meghatározása MPN-módszerrel.	37
5.2. Lemezöntéses élősejtszám-meghatározás	37
5.2.1. Fűszerpaprika mezofil aerob mikrobaszámának meghatározása lemezöntéssel	38
5.3. Élősejtszám-meghatározás szélesztéssel	39
5.3.1. Fűszerbors mezofil aerob mikrobaszámának meghatározása szélesztéssel	39
6. Spórás baktériumok számának meghatározása	40
6.1. Száritmányok aerob spórás baktériumszámának a meghatározása. A <i>Bacillus cereus</i> jelenlétének kimutatása szelektív táptalajon	40
6.2. Anaerob spórás baktériumok számának a meghatározása örlött borsból és fűszerpaprikából	43
7. Mikroszkopikus gombák kimutatása és vizsgálata különféle élelmiszerekből	45
7.1. Élesztőgombák kimutatása és vizsgálata	45
7.1.1. Az élesztőgombák vizsgálata natív preparátum segítségével	46
7.1.2. Élesztőgombák vizsgálata élő festett készítményekkel (vitális festés).	46
7.1.3. Élesztőgombák izolálása szelektív táptalajon	47

7.1.4. Élesztőgombák számának meghatározása üdítőitalokból	48
7.2. A mikroszkopikus penészgombák kimutatása és vizsgálata	49
7.2.1. Penészgombák kimutatása fűszerekből és lisztből.	50
7.2.2. A penészgombák mikroszkópos vizsgálata	51
8. Élelmiszer-eredetű megbetegedést okozó baktériumok izolálása szelektív táptalajokon	54
9. A szaporodás hőmérséklet-igényének a meghatározása	58
10. Fagyasztott élelmiszerek mikrobiológiai vizsgálata	61
11. Ozmózis-hatások vizsgálata mikroorganizmusokon	64
12. Antibiotikumok hatásának vizsgálata antibiotikumkorongok segítségével.	66
13. Növényi antimikrobiális anyagok hatásának vizsgálata	69
14. Tej mikrobiológiai vizsgálata redukciós próbákkal	72
14.1. Metilénkék redukciós próba	73
14.2. Rezaszurinos próba	74
15. Tejsavbaktériumok számának meghatározása Breed-módszerrel	76
16. Fermentált tejtermékek mikrobiológiai minőségének vizsgálata	79
17. Friss zöldségek és gyümölcsök mikrobiológiai vizsgálata	83
18. Konzervek mikrobiológiai vizsgálata	86
19. Sütőipari termékek mikrobiológiai vizsgálata	89
20. Húsok és húskészítmények mikrobiológiai vizsgálata	92
21. Ivóvíz mikrobiológiai vizsgálata	95
21.1. Ivóvíz mezofil aerob és pszichrotróf baktériumszámának meghatározása lemezöntéssel	96
21.2. A koliform baktériumok és az <i>Escherichia coli</i> kimutatása	97
21.3. Fekális eredetű <i>Streptococcusok</i> (<i>Enterococcusok</i>) kimutatása	99
21.4. Anaerob szulfitredukáló baktériumok (<i>Clostridiumok</i>) kimutatása	100
21.5. A <i>Pseudomonas</i> baktériumok kimutatása	101
21.6. Ivóvízben előforduló mikroszkopikus penészgombák kimutatása	101
22. Palackok tisztaságának a vizsgálata (öblítéses módszer)	103
23. Élelmiszerekből izolált baktériumok meghatározásához használt biokémiai megerősítő vizsgálatok	105
23.1. A mikroorganizmusok szénhidrát-hasznosító tulajdonságainak kimutatása	105

23.1.1. A szénhidrátbontó tulajdonságok vizsgálata peptonvízben kék-bromtimollal.	105
23.1.2. Baktériumok laktózerjesztésének vizsgálata	105
23.1.3. Metilvörös reakció	106
23.2. A baktériumok fehérjebontó képességének a kimutatása.	106
23.2.1. Zselatinolízis teszt	106
23.2.2. A triptofán hidrolízise	106
23.3. A kataláz kimutatása	107
23.4. A kénhidrogén-képződés kimutatása ólomacetát-oldattal átitatott szűrőpapírcsíkok módszerével	107
23.5. Karbamid-hidrolízis teszt.	108
23.6. Politróp táptalajok használata a baktérium diagnosztikában	108
Szakirodalom.	109
Rezumat	112
Abstract	113
A szerzőről.	114

CUPRINS

Prefață	17
1. Reglementări de protecția muncii care trebuie respectate în laboratorul de microbiologie	19
2. Prelevare și pregătire pentru analiza microbiologică a alimentelor	21
3. Detectarea microorganismelor prezente în mediul înconjurător.	23
3.1. Cultivarea germenilor din aer cu metoda sedimentării	24
3.2. Testarea contaminării suprafețelor, pereților, hainelor de laborator ...	25
3.3. Investigarea contaminării microbiene a suprafeței pielii	26
4. Examinarea microscopică a bacteriilor importante pentru alimente	28
4.1. Examinarea bacteriilor prin colorație compusă. Colorația Gram	28
4.2. Evidențierea sporilor bacterieni prin metoda de colorare Schaeffer-Fulton	30
5. Determinarea numărului de celule vii prin metode de cultivare	34
5.1. Determinarea numărului de celule prin metoda MPN	35
5.1.1. Determinarea numărului de celule mezofile aerobe din legume congelate prin metoda MPN	37
5.2. Determinarea numărului de celule vii prin metoda turnării în placă ...	37
5.2.1. Determinarea numărului de microorganisme mezofile aerobe din boia de ardei prin metoda turnării în placă.	38
5.3. Determinarea numărului de celule vii prin metoda de însămânțare la suprafața plăcii.	39
5.3.1. Determinarea numărului de microorganisme mezofile aerobe din piper prin metoda de însămânțare la suprafața plăcii	39
6. Determinarea numărului de bacterii sporulate	40
6.1. Determinarea numărului de bacterii sporulate aerobe din produse vegetale uscate. Evidențierea prezenței bacteriei <i>Bacillus cereus</i> pe mediu nutritiv selectiv	40
6.2. Determinarea numărului de bacterii sporulate anaerobe din piper măcinat și boia de ardei.	43
7. Determinarea și studiul fungilor microscopice din diferite alimente	45
7.1. Determinarea și studiul drojdiilor	45
7.1.1. Studiul drojdiilor cu preparate microscopice native.	46
7.1.2. Studiul drojdiilor cu preparate microscopice obținute prin colorare vitală.	46

7.1.3. Izolarea drojdiilor pe medii nutritive selective	47
7.1.4. Determinarea numărului de drojdii din băuturi răcoritoare	48
7.2. Determinarea și studiul mucegaiurilor microscopice	49
7.2.1. Determinarea mucegaiurilor microscopice din condimente și făină	50
7.2.2. Studiul microscopic a mucegaiurilor microscopice	51
8. Izolarea bacteriilor cu rol în bolile de origine alimentară pe medii selective	54
9. Determinarea necesității de temperatură a multiplicării microorganismelor	58
10. Studiul microbiologic al alimentelor congelate	61
11. Studiul efectelor osmotice asupra microorganismelor	64
12. Studiul efectului antibioticelor folosind discuri cu antibiotice	66
13. Studiul efectului substanțelor vegetale antimicrobiene	69
14. Studiul microbiologic al laptelui cu proba reductazei	72
14.1. Proba reductazei cu albastru de metilen	73
14.2. Proba reductazei cu resazurină	74
15. Determinarea numărului de bacterii lactice prin metoda Breed	76
16. Studiul calității microbiologice a produselor lactate fermentate	79
17. Studiul microbiologic al legumelor și fructelor proaspete	83
18. Studiul microbiologic al conservelor	86
19. Studiul microbiologic al produselor de panificație	89
20. Examinarea microbiologică a cărnii și a preparatelor din carne	92
21. Analiza microbiologică al apei potabile	95
21.1. Determinarea numărului de bacterii mezofile aerobe și psihrotrofe din apă potabilă	96
21.2. Determinarea bacteriilor coliforme și a <i>Escherichia coli</i>	97
21.3. Determinarea streptococilor (enterococilor) fecali	99
21.4. Determinarea bacteriilor sulfite-reducătoare anaerobe (<i>Clostridium</i>)	100
21.5. Determinarea bacteriilor <i>Pseudomonas</i>	101
21.6. Determinarea mucegaiurilor microscopice din apă potabilă	101
22. Testarea curățeniei sticlelor (metoda clătirii)	103
23. Teste de confirmare biochimice utilizate în scopul identificării bacteriilor izolate din alimente	105
23.1. Evidențierea proprietăților de utilizare a glucidelor	105

23.1.1. Evidențierea proprietăților zaharolitice în apă peptonată cu albastru bromtimol	105
23.1.2. Studiul fermentării lactozei la bacterii	105
23.1.3. Reacția roșu de metil	106
23.2. Evidențierea proprietăților proteolitice ale bacteriilor	106
23.2.1. Testul de gelatinoliză	106
23.2.2. Hidroliza triptofanului	106
23.3. Evidențierea catalazei	107
23.4. Evidențierea producerii de hidrogen sulfurat prin metoda benzilor cu acetat de plumb	107
23.5. Testul de hidroliză a ureei	108
23.6. Utilizarea mediilor politrope în diagnosticul bacterian	108
Bibliografie.	109
Rezumat	112
Abstract	113
Despre autor.	114

CONTENTS

Foreword	17
1. Microbiology laboratory safety rules and procedures	19
2. Sampling and preparation for the microbiological analysis of foods	21
3. Detection of microorganisms present in the environment.	23
3.1. Cultivation of germs in the air by sedimentation method	24
3.2. Testing the contamination of laboratory tables, walls, and clothing	25
3.3. Investigation of the microbial contamination of skin surface	26
4. Microscopic examination of food-relevant bacteria.	28
4.1. Examination of bacteria by complex staining, Gram colouration	28
4.2. Detection of bacterial spores by the Schaeffer–Fulton staining method	30
5. Determination of total viable count by culture methods.	34
5.1. Determination of total viable count by the Most Probable Number method	35
5.1.1. Determination of the number of aerobic mesophilic microorganisms from frozen vegetables by the MPN method	37
5.2. Determination of the total viable count by the pour plate method	37
5.2.1. Determination of the number of aerobic mesophilic microorganisms from paprika by the pour plate method	38
5.3. Determination of the total viable count by the spread plate method	39
5.3.1. Determination of the number of aerobic mesophilic microorganisms from pepper by the spread plate method	39
6. Determination of the number of spore-forming bacteria	40
6.1. Determination of the number of aerobic spore-forming bacteria from dehydrated vegetable products. Detection of the presence of <i>Bacillus cereus</i> bacteria on selective nutrient media	40
6.2. Determination of the number of anaerobic spore-forming bacteria from ground pepper and paprika	43
7. Determination and study of microscopic fungi from different foods	45
7.1. Determination and study of yeasts	45
7.1.1. Study of yeasts with native microscopic preparations	46
7.1.2. Study of yeasts with vital staining.	46
7.1.3. Isolation of yeasts on selective nutrient media	47
7.1.4. Determination of the number of yeasts from soft drinks.	48

7.2. Determination and study of microscopic moulds.	49
7.2.1. Determination of microscopic fungi from spice and flour	50
7.2.2. Microscopic examination of molds	51
8. Isolation of bacteria with role in foodborne diseases on selective media	54
9. Determination of the temperature condition for reproduction	58
10. Microbiological study of frozen foods	61
11. Study of osmotic effects on microorganisms	64
12. Study of the effect of antibiotics using antibiotic discs.	66
13. Study of the effect of antimicrobial vegetal substances	69
14. Microbiological study of milk with reductase test	72
14.1. Reductase test with methylene blue	73
14.2. Resazurin reductase test	74
15. Determination of the number of lactic acid bacteria with the Breed method	76
16. Examination of the microbiological quality of fermented milk products.	79
17. Microbiological examination of fresh vegetables and fruits	83
18. Microbiological examination of canned foods	86
19. Microbiological examination of bakery products.	89
20. Microbiological examination of meats and meat products	92
21. Microbiological analysis of drinking water	95
21.1. Determination of the number of aerobic mesophilic and psychrotrophic bacteria from drinking water	96
21.2. Determination of coliform bacteria and <i>Escherichia coli</i>	97
21.3. Determination of fecal streptococci (<i>enterococci</i>).	99
21.4. Determination of anaerobic sulphite-reducing bacteria (<i>Clostridium</i>). . .	100
21.5. Determination of <i>Pseudomonas</i> bacteria	101
21.6. Determination of microscopic fungi from drinking water	101
22. Bottle cleaning test (rinsing method)	103
23. Biochemical confirmatory tests used to identify bacteria isolated from food	105
23.1. Carbohydrate utilization tests	105
23.1.1. Determination of carbohydrate utilization in peptone water with bromothymol blue	105

23.1.2. Lactose fermentation test	105
23.1.3. Methyl red reaction.	106
23.2. Determination of proteolytic properties of bacteria	106
23.2.1. Gelatine hydrolysis test	106
23.2.2. Tryptophan hydrolysis	106
23.3. Determination of catalase	107
23.4. Hydrogen sulphide detection by lead acetate paper strip	107
23.5. Urea hydrolysis test	108
23.6. Utilization of polytrophic media in bacterial diagnosis	108
References	109
Rezumat	112
Abstract	113
About the author	114

ELŐSZÓ

Az élelmiszer-mikrobiológia az élelmiszer-tudomány gyakorlati jellegű és folyamatosan fejlődő ága. Az élelmiszer-mikrobiológiai ismeretek, a megfelelő mikrobiológiai szemlélet kialakulása nélkülözhetetlen azon jövőbeli szakemberek számára, akik tevékenységük által a jó minőségű, romlásmentes és biztonságos élelmiszerek előállításán dolgoznak.

Az Élelmiszer-mikrobiológia laborgyakorlatok jegyzet célja az élelmiszer-mikrobiológiai ismeretek bővítése és elmélyítése, a mikrobiológia laboratóriumi munkával kapcsolatos gyakorlati készségek fejlesztése. Egy átlátható, lépésről lépésre haladó útmutató, amely az elméleti háttér bemutatásával kezdve, a gyakorlati munka részletes leírásán keresztül vezet el az eredmények kiértékeléséig. A gyakorlatok nem csak bemutató jellegűek, hanem teljes mértékben kivitelezhetők a hallgatók által, az eredmények feldolgozásával és kiértékelésével együtt.

A jegyzet a bevezetőben tartalmazza a mikrobiológia laboratóriumban betartandó munkavédelmi rendszabályokat és az élelmiszerek mikrobiológiai vizsgálatának eredményességéhez szükséges mintavételre és előkészítésre vonatkozó elvárásokat. Ezt követi a környezetünkben előforduló mikroorganizmusok kimutatása, melynek jelentősége abban nyilvánul meg, hogy felhívja a figyelmet az elővigyázatosságra a laboratóriumi munka és az élelmiszer-előállítás során egyaránt. A jegyzet tartalmazza azokat a laborgyakorlatokat, amelyek az élelmiszerek szempontjából jelentős mikroorganizmusok (baktériumok, élesztőgombák, penészgombák) tulajdonságainak a vizsgálatát teszik lehetővé mikroszkópi technikákkal, kimutatásukat tenyésztési eljárásokkal, valamint az alapvető élősejtszám-meghatározási módszereket. A mikroorganizmusok életét befolyásoló különböző tényezők közül a hőmérséklet, a vízaktivitás, az antibiotikumok és a különféle növényi eredetű anyagok hatásának vizsgálatát bemutató gyakorlatok említhetők meg. A laborgyakorlat útmutató kiemelt jelentőségű része a különféle élelmiszerek: friss zöldségek és gyümölcsök, tej és tejtermékek, sütőipari termékek, hús és húskészítmények, konzervek és az ivóvíz mikrobiológiai minőségének vizsgálatára vonatkozó módszerek leírása. Az utolsó fejezet az élelmiszerekből izolált baktériumok beazonosításához felhasználható biokémiai megerősítő vizsgálatokat tartalmazza.

A jegyzet elsősorban az élelmiszeripari mérnök szakos egyetemi hallgatók gyakorlati képzését szolgálja, de jól használható más alap- és mesterszakos hallgatók által is, akik élelmiszerekkel kapcsolatos mikroorganizmusokról és azok élettevékenységeiről, jelentőségéről tanulnak. A különféle minták és mikroorganizmusok vizsgálatát leíró gyakorlatok, kísérletek megalapozhatják a hallgatók tudományos kutatás iránti érdeklődését is.

1. A MIKROBIOLÓGIA LABORATÓRIUMBAN BETARTANDÓ MUNKAVÉDELMI RENDSZABÁLYOK

A mikrobiológia gyakorlatok során a vegyszerek (savak, lúgok, mérgező anyagok), az elektromos és gázkészülékek kezelésével, a tűzvédelemmel kapcsolatos rendszabályokon túl a mikrobiológiai fertőzésveszély miatt egyéb óvintézkedéseket, rendszabályokat is szigorúan be kell tartani. A gyakorlatokon tartsuk be a gyakorlatvezető oktató utasításait.

1. A mikrobiológiai gyakorlatokon védőköpenyt kell viselni. A köpeny legyen megfelelően hosszú és tiszta!
2. A laboratóriumba való érkezéskor, illetve távozás előtt kezet kell mosni fertőtlenítő folyadékkal!
3. A gyakorlat alatt kötelező a hosszú haj feltűzése, mivel balesetveszélyes (gázlágnál meggyúlhat, mikrobatenyészetekbe belelőghat)!
4. A laboratóriumban étkezni, dohányozni vagy a laboratóriumi eszközöket, berendezéseket egyéb célra használni tilos!
5. Minden mikrobatenyészetet kórokozó tenyészetként kell kezelni, annak ellenére, hogy a laborgyakorlatokon fertőző mikroorganizmusokkal nem dolgozunk! Az általunk használt mikroorganizmusok mellett a tenyészetbe bekerülhetnek és elszaporodhatnak ismeretlen, esetleg kórokozó mikrobák is.
6. Élő mikrobatenyészet kiömlése esetén fertőtleníteni kell a szennyeződött felületet! Az esetről értesíteni kell a gyakorlatvezető oktatót.
7. Élő mikrobatenyészeteket tilos a lefolyóba önteni! Elpusztításuk hővel vagy vegyszerrel történik.
8. Tenyészetet tilos elvinni a laboratóriumból!
9. Csak autoklávozással sterilizált vagy vegyszerekkel fertőtlenített edényeket, eszközöket szabad elmosogatni!
10. Ne öntsünk a lefolyóba agart tartalmazó táptalajt, mert a hirtelen lehűlő és megszilárduló agar elzárhatja a csőrendszert!
11. Az oltókacsot megfelelő technikával kell leégetni!
12. Mikrobák átoltása során a láng közelében dolgozunk, ne beszéljünk, ne járkáljunk, és tilos ilyenkor a szellőztetés!
13. Nem tartunk vagy dolgozunk gyúlékony folyadékokkal gázégő közelében!
14. Veszélyes vegyszerek, élő mikroorganizmus tenyészetek szájjal való pipettázása tilos! Alkalmasak erre a célra az automata pipetták, viszont ha ezek nem állnak rendelkezésünkre, pipettázáskor használjunk gumilabdát vagy mechanikus pipettázó készüléket (ún. Pipetust).

15. Csak kifogástalan állapotban levő eszközöket, berendezéseket használjunk! Tilos a sérült, törött üvegeszközök használata!
16. Az UV (germicid) lámpát a laboratóriumban való tartózkodás idején kapcsoljuk ki, mert súlyos szem- vagy bőrkárosodásokat okozhat!
17. Az esetleges személyi baleseteket azonnal jelenteni kell a gyakorlatvezető oktatónak!
18. A munka befejeztével az asztalon rendet kell hagyni és fertőtlenítő oldattal le kell törölni.

2. MINTAVÉTEL ÉS ELŐKÉSZÍTÉS AZ ÉLELMISZEREK MIKROBIOLÓGIAI VIZSGÁLATA SORÁN

Az élelmiszer-vizsgálatok módját több tényező határozza meg, ezek a következők: az élelmiszer állaga (szilárd vagy folyékony), a feldolgozás technológiája (nyers állapotú, konzerv, sűrítmény, hűtött, fagyasztott vagy porított termék), a vizsgálatok célja (alapanyagok, segédanyagok, félkész- és késztermékek mikrobiológiai minősítése, kórokozó és romlást okozó mikroorganizmusok vizsgálata, higiénias állapot szerinti minősítés).

Az élelmiszerek sikeres mikrobiológiai vizsgálatának feltétele és legfontosabb lépése a mintavétel, majd ezt követően a minta előkészítése és elemzése. A mintának megfelelően kell képviselnie az egész anyagot, amelyből származik, és a szennyeződésnek leginkább kitett részekből is kell tartalmaznia. A mikrobiológiai vizsgálatokhoz a mintákat steril eszközökkel (kanál, csipesz, pipetta stb.) kell venni oly módon, hogy utószennyeződés révén olyan mikroorganizmusok ne kerülhessenek a mintába, amelyek eredetileg nem voltak benne. Csomagolás nélküli anyagok mintavételéhez csak olyan száraz, tiszta, sima felületű, jól sterilizálható edények és eszközök használhatók, amelyek a minta eredeti mikrobiológiai állapotát nem befolyásolják. Nem ajánlott az üvegpalackok használata az esetleges törés általi anyagvesztés és üvegdarabokkal való környezeti szennyeződés miatt.

A mintát a lehető legrövidebb idő alatt a laboratóriumba kell szállítani, általában hűtve, hogy elkerüljük a mikroorganizmusok szaporodását. Fagypont alá hűteni sem a szállítás, sem az átmeneti tárolás alatt nem szabad (kivéve a fagyasztott élelmiszereket). A kereskedelmileg steril élelmiszerek normál körülmények között szállíthatók és szobahőmérsékleten tárolhatók. Ha termofil baktériumokkal való romlás gyanúja áll fenn, akkor nem ajánlott a hűtés, mivel a vegetatív sejtek elhalását okozhatja.

A vizsgálatokhoz a mintákból kisebb mennyiségeket, 1, 5, 10, 25 g-ból álló almintákat kell venni, majd ezeket általában folyadékba kell szuszpendálni és homogenizálni. Mennyiségi vizsgálatoknál az alapsuszpenzió hígítása általában 1:10 arányú.

A termék felületén vagy belsejében levő mikrobák vizsgálatához a szilárd halmazállapotú élelmiszereket alkalmassá kell tenni hígítások készítésére. A folyamatot homogénezésnek vagy egyneműsítésnek nevezzük, és erre a célra leggyakrabban homogénező készüléket használunk (1. ábra). A folyékony élelmiszerek egyszerű összerázással homogénezhetők, például vortex keverő segítségével.



1. ábra. Mikrobiológiai homogénező készülék

(<https://hu.vwr.com/store/product/11702611/mikrobiologiai-homogenizator-stomacher-400-circulator>)

Szárítmányok esetében 10 g mintát mérünk ki 90 ml steril hígítófolyadékba (fiziológiás sóoldat vagy 0,1%-os peptonoldat), összerázzuk, és 25-30 percig szobahőmérsékleten állni hagyjuk visszanedvesítés céljából, majd ezt követően újból alaposan homogénezzük.

Felületen található mikrobákat általában hűtve tárolt gyümölcs- és zöldségféléken vizsgálunk, a mélyhűtött termékek esetében csak azoknál, ahol a termék belsejében nem várható mikroorganizmus. Ebben az esetben a vizsgálandó termékből 200-500 g-ot mérünk, és 500 ml hígítófolyadékkal jól összerázzuk. Az így nyert folyadékból készítjük a hígítási sort.

A mintában található mikroorganizmusokat megfelelő tápközegeben, kedvező környezeti körülmények között elszaporítva tenyésztéssel mutatjuk ki.

Az élelmiszer-mikrobiológia laboratórium fő feladata az élelmiszerekben jelen lévő mikroorganizmusok mennyiségi és minőségi kimutatása. A mintavétel módját, kezelését szabvány írja elő.

3. A KÖRNYEZETÜNKBEN ELŐFORDULÓ MIKROORGANIZMUSOK KIMUTATÁSA

A laborgyakorlat célja:

A mikroorganizmusok széles körű elterjedésének kimutatása, valamint a figyelem arra való ráirányítása, hogy a nem megfelelő laboratóriumi műveletek milyen könnyen veszélyeztethetik a mikrobiológiai munkavégzés tisztaságát, és milyen mértékben befolyásolják a vizsgálatok során kapott eredményeket.

Elméleti háttér:

A mikroorganizmusok minden életteret benépesítenek (levegő, talaj, víz, üledékek, a földkéreg mély rétegei, élő szervezetek), jelentős részük igen hasznos, sőt nélkülözhetetlen funkciókat töltenek be, mint például a biogén elemek körforgásában részt vevő mikroorganizmusok.

A mikroorganizmusok többségénél a sejtek mérete a mikrométeres ($1\ \mu\text{m} = 10^{-6}\text{m}$) nagyságrendbe esik, ezért az egyedi sejtek vizsgálata korlátozott. A vizsgálatok túlnyomó többsége mikrobapopulációkkal történik, amelyek a sejtek millióit tartalmazzák. Ezek a populációk a mikroorganizmusok elszaporodásával jönnek létre, természetes közegekben vagy mesterséges, laboratóriumi táptalajokon. A telep (kolónia) általában egymással kapcsolatban álló individuális sejtekből áll, de bizonyos baktériumok, például a *Streptomyces* fajok fonalképzők, így micéliális telepeket alakítanak ki. A laboratóriumban alkalmazott tenyésztési eljárások során a telep szilárd táptalajon vagy annak belsejében alakul ki, rendszerint egyetlen sejtől vagy telepképző egységből fejlődő külön álló sejtömeg. A teleptípusok vizsgálatánál figyelembe kell venni a telepek alakját, szegélyét, kiemelkedését.

A környezetből a legtöbb élelmiszer szennyeződik mikroorganizmusokkal, amelyek közül csak azok szaporodhatnak el és válnak a termék specifikus mikrobatársulásának részévé, majd alakítják ki a romlási társulást, amelyek élettani tulajdonságai megfelelnek a környezeti tényezők adta lehetőségeeknek. Az allochton mikroorganizmusok között élelmiszerrel terjedő megbetegedést okozók is előfordulhatnak. Az élelmiszereket szennyező mikroorganizmusok származhatnak a talajból, a vízből, a levegőből, a romlott hulladékokból, a nem megfelelően tiszta szállító- és feldolgozóeszközökről, a berendezésekről, az élelmiszerrel foglalkozó emberekről vagy más specifikus forrásokból.

A mikrobiológiai mintavételezés során gyakran kerül sor az eszközök, berendezések felületének vizsgálatára. Ez esetben meg kell határozni, hogy a mintázás mekkora felületre vonatkozzék és milyen módon történjék. A felületet steril, nedves vattatamponnal lemosva vagy az adott felületre szilárd táptalajt közvetlenül

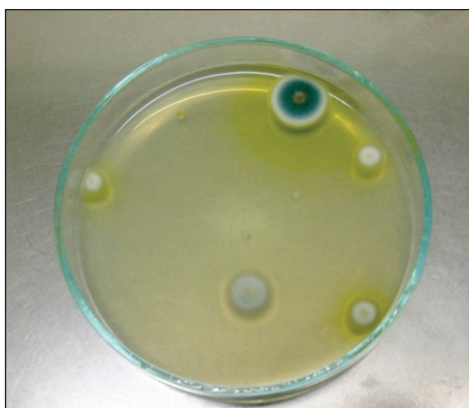
rányomva lehet mintázni. Megfelelő ragtapaszt is lehet alkalmazni, amelyet bizonyos idő elteltével a felületről lehúzva táptalajra helyeznek.

A levegő vizsgálatának legegyszerűbb módja, ha egy táptalajt tartalmazó Petri-csésze fedelét eltávolítva bizonyos ideig (10-30 percig) szabaddá tesszük a levegőből ráhulló mikrobásejtek, spórák, konídiumok számára. A levegővizsgálatra alkalmas berendezés használata esetén ismert mennyiségű levegőt átszívatta a mikrobás szennyeződést membrán segítségével szűrjük ki vagy tápagarlemez fel-színével ütköztetve fogjuk fel.

A gyakorlat menete:

3.1. A levegőben levő csírák kitenyésztése szedimentációs módszerrel

Steril Petri-csészékbe a baktériumok kimutatása céljából Nutrient táptalajt, a mikroszkopikus penészgombák számára Czapek Dox táptalajt töltünk. Miután a táptalaj megszilárdult, a Petri-csészéket fedetlenül kihelyezzük 10, illetve 30 per-cig a laboratórium, valamint az intézmény különböző helyiségeiben (például folyosó, étkeзде, könyvtár stb.), de akár az épületen kívül is. Ez idő alatt a leve-gőben előforduló mikrobák rákerülnek a táptalaj felületére, és az inkubálási idő alatt a táptalaj felületén elszaporodva telepeket hoznak létre (2. ábra). Az inkubá-lás a baktériumok kimutatása esetén 48 óráig tart 37 °C-on, míg a mikroszkopikus penészgombák esetében 5 napig 28 °C-on.



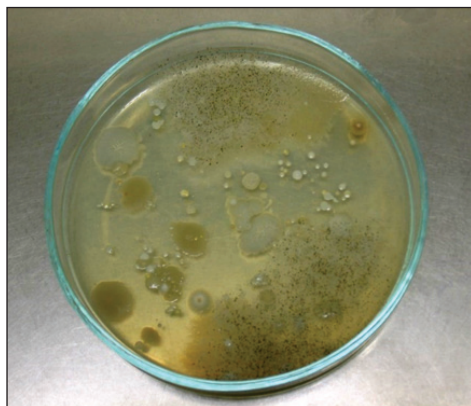
2. ábra. *A mikrobiológia laboratórium levegőjéből származó mikroorganizmusok telepei*

3.2. Laboratóriumi asztalfelületek, fal, ruházat fertőzöttségének tesztelése

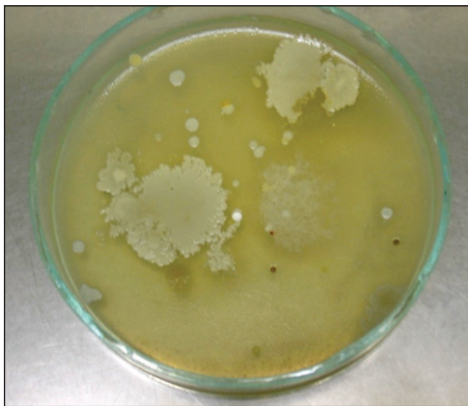
Steril mintavevő (például vattatampon) segítségével különféle felületekről (bútorzat, fal, köpeny, evőeszköz, írószer stb.) veszünk mintát (3., 4., 5., 6. ábra). A steril vattatampon a vizsgálandó felületen végighúzzuk, majd inokuláljuk az előzetesen Petri-csészékben kitöltött táptalajokat (Nutrient táptalaj, Czapek Dox táptalaj). Ezt követően a Petri-csészéket inkubátorba helyezzük 48 óráig 37 °C-ra, illetve 5 napig 28 °C-ra.



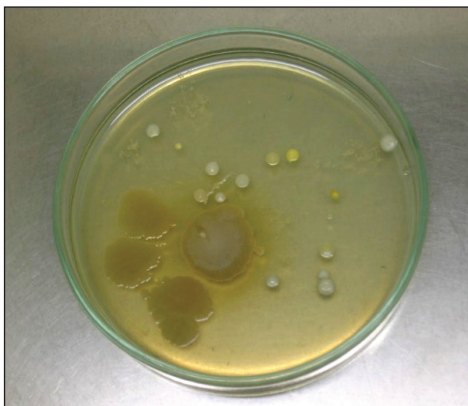
3. ábra. A laboratóriumi asztalfelületről származó baktériumok telepei Nutrient táptalajon



4. ábra. A laboratóriumi fali csempe felületéről vett mintavétel során kifejlődött mikroorganizmusok Nutrient táptalajon



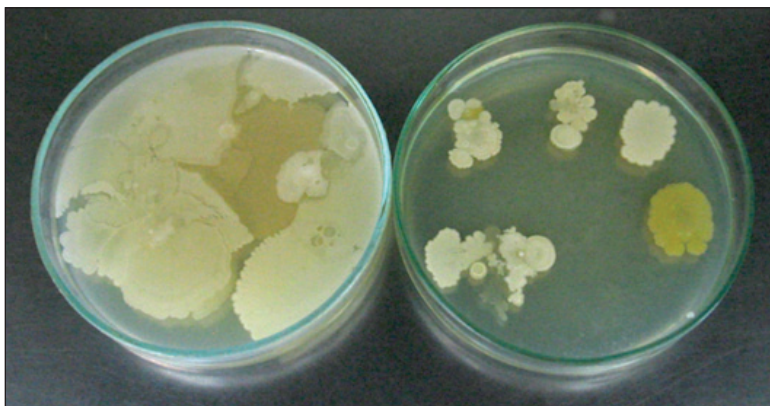
5. ábra. *Nem steril vegyszerkanál felületéről származó mikroorganizmusok*



6. ábra. *Laboratóriumi köpeny felületéről származó baktériumok*

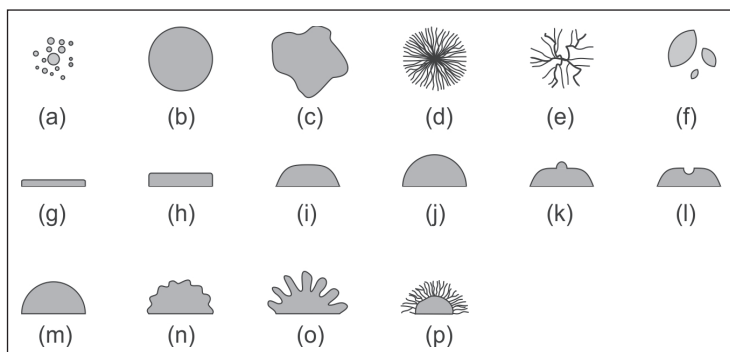
3.3. Bőrfelület mikrobás szennyezettségének vizsgálata

Kézmosás előtt ujjainkat hozzáérintjük a Petri-csészékbe előzetesen kitöltött és megszilárdult Nutrient táptalaj felszínéhez. Ezt megismétljük szappanos kézmosást követően is (7. ábra). A Petri-csészéket inkubátorba helyezzük 48 óráig 37 °C hőmérsékletre.



7. ábra. A kézfelületen előforduló baktériumok telepei kézmosás előtt és kézmosás után

A gyakorlat értékelése tulajdonképpen a kifejlődött baktérium- és penészgombatelepek megfigyelése és számlálása. A baktériumtelepek morfológiai sajátosságainak vizsgálata során a következő jellemzőket értékeljük: a telep mérete (átmérő mm-ben), alakja (pontszerű, kör, szabálytalan, fonálszerű, rizoid, orsó), a telep kiemelkedése (lapos, domború, párnaszerűen feldomborodó, csúcsos, bemélyedő), szegélye (ép, hullámos, lebenyes-karéjos, csipkézett, fonalas), színe (8. ábra). A telep felülete, denzitása és konzisztenciája szintén értékelhető jellemzők.



8. ábra. A baktériumtelepek morfológiai tulajdonságai (Tóth et al. 2019)

Alak: (a) pontszerű, (b) kör alakú, (c) szabálytalan, (d) fonálszerű, (e) rizoid, (f) orsó alakú.

Telepkiemelkedés: (g) lapos, (k) lapos kiemelkedő, (i) domború,

(j) párnaszerűen feldomborodó, (k) csúcsos, (l) bemélyedő.

Telepszegély: (m) ép, (n) hullámos, (o) karéjos, (p) fonalas

4. ÉLELMISZEREK SZEMPONTJÁBÓL JELENTŐS BAKTÉRIUMOK MIKROSZKÓPI VIZSGÁLATA

4.1. Baktériumok vizsgálata összetett festéssel. Gram-festés

A laborgyakorlat célja:

A mikrobiológiában a baktériumok rendszerezése során első lépésként alkalmazott és diagnosztikai jelentőségű festési eljárás alkalmazása az élelmiszerekkel terjedő megbetegedést okozó baktériumok vizsgálata és kimutatása során.

Elméleti háttér:

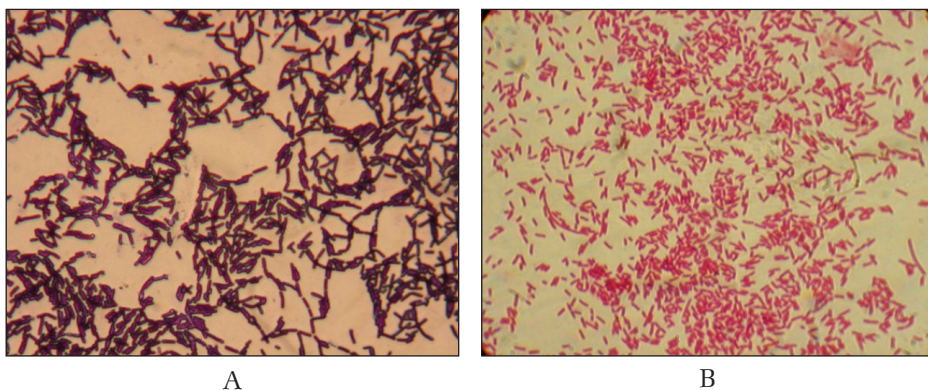
A Gram-festés a mikroorganizmusok vizsgálatára alkalmas kettős festési módszer. Hans Christian Gram dán tudós dolgozta ki 1884-ben a kórokozó baktériumok szövetekben való kimutatására. A Gram-festés alapján a baktériumok két csoportra oszthatók aszerint, hogy megtartják-e a festési módszernél elsőként használt festék kékes-ibolya színét (Gram-pozitív baktériumok) (9A ábra), vagy elveszítik azt és a második festésnél rózsaszínűre színeződnek (Gram-negatív baktériumok) (9B ábra). Bár akkor az eltérő festődés oka ismeretlen volt, később kiderült, hogy a festődés háttérében a baktériumok sejtfalszerkezetének alapvető különbsége áll.

A sejtfal rigid (merev) szerkezet, meghatározza a sejt alakját és megőrzi annak integritását a változó környezeti ozmotikus viszonyok között. A baktériumsejtfal ezen jellegzetességeit az alkotásában részt vevő peptidoglikánnak köszönheti, amely egy rugalmas rácsszerkezetet képez, ugyanakkor elég merev a baktérium alaktartásához. A peptidoglikán egy olyan térhálós óriásmolekula, amely alternáló N-acetil-glükózamin és N-acetil-muraminsavból felépülő glükánból és a glükánlancok között keresztkötéseket létrehozó rövid peptidekből épül fel. A keresztkötő peptidek szerkezete az egyes baktériumcsoportokban eltérő. A Gram-negatív baktériumok sejtfalában a poliszacharid-láncokat tetrapeptid-hidak kötik össze, a Gram-pozitív baktériumok esetében a tetrapeptid-hidakat is egy vagy több aminosav kapcsolja össze, így például a *Staphylococcus aureus* esetén 5 glicin-molekula.

A Gram-pozitív baktériumok sejtfalában a peptidoglikán többrétegű (a rétegek száma akár 40 is lehet) és a peptidrésze bonyolultabb. A Gram-negatív baktériumok sejtfalát kívül egy külső membrán és ez alatt egy vékony peptidoglikán réteg alkotja. A külső membrán lipoproteineket, lipopoliszacharidokat és fehérjéket tartalmaz.

A Gram-festési eljárás során egymást követően kristályibolya és káliumjodidos jóoldattal történő festés, alkoholos mosás, majd szafraninnal történő

festés követi egymást. A kristályibolya (hexametil-pararozanilin) vizes oldatban kristályibolya- (CV^+) és klór- (Cl^-) ionokra disszociál. Ezek az ionok behatolnak a Gram-pozitív és a Gram-negatív baktériumok sejtfalába. A kristályibolya-ionok a baktériumsejt negatív töltésű komponenseivel kerülnek kölcsönhatásba és a sejtet lilára színezik. A kálium-jodidos jódoldat a kristályibolyával nagy kristályokat képez, amelyek a peptidoglikán térhálóban megrekednek. Mivel a peptidoglikán térrács a Gram-pozitív sejtek falában vastagabb, ezért ezek festődése intenzívebb. A Gram-negatív baktériumok esetében az alkoholos mosás a külső membrán lipidjeinek kioldása után a vékony peptidoglikánrétegből könnyebben kioldja a festéket. Mivel ez után a lépés után a Gram-negatív sejtek színtelenek, a könnyebb felismerés céljából alkalmazzuk a második festést szafaninnal. A festés után a Gram-pozitív sejtek sötétlila színűek, a Gram-negatív sejtek pedig pirosak lesznek.



A

B

9. ábra. Gram-pozitív baktérium – *Bacillus cereus* (A),
Gram-negatív baktérium – *Escherichia coli* (B)

A Gram-jelleg a tenyészetek kora szerint változik, ezért igen fontos, hogy a festést mindig 24 órás tenyészetben végezzük.

A gyakorlat menete:

A gyakorlat során a következő baktériumok tenyészeiből készítünk mikroszkópi preparátumot a Gram-festési eljárást alkalmazva: *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*.

A preparátumkészítés lépései:

- Kenetkészítés a vizsgált baktérium szuszpenziójából;
- Szárítás levegőn;
- Rögzítés lángnál;
- Festés 4 szakaszban:

1. kristály-ibolya 1-2 perc, majd öblítés vízzel;
2. kezelés Lugol-oldattal – kétszer megismételve:
 - a) 3-5 másodpercig,
 - b) 3-5 percig;
3. differenciálás alkohol-acetonnal, ezt a műveletet mindaddig végezzük, míg nem jut festék a színtelenítő oldatba; öblítés vízzel;
4. újrafestés safraninnal 1-2 perc, öblítés vízzel, szárítás.

Ezt követően az így elkészített preparátumot mikroszkópos vizsgálatnak vetjük alá.

Értékelés:

A mikroszkópi képen megfigyelhető sejtek festődése alapján a baktériumokat a megfelelő Gram-csoportba soroljuk. A füzetünkbe rajzot készítünk a sejtek alakjáról és elrendeződéséről.

4.2. A baktériumspóra kimutatása Schaeffer–Fulton festési módszerrel

A laborgyakorlat célja:

Az endospóráképző, élelmiszeripari jelentőségű *Bacillus cereus* baktérium spóráinak kimutatása és a vegetatív sejtektől való elkülönítése az ún. Schaeffer–Fulton festési technikával.

Elméleti alapok:

1. Spóráképződés a baktériumoknál

A baktériumspórák olyan szerkezetek, amelyek ellenállók a magas hőmérséklettel, sugárzásokkal, kiszáradással és kémiai tényezőkkel (pl. fertőtlenítőszerekkel) szemben. A spórák nyugalmi állapotban még akár több ezer évig is fennmaradhatnak (2-3000 éves régészeti leletekből is sikerült életképes spórákat izolálni).

Az endospórákat több baktérium nemzetségnél is kimutatták, mint például: *Bacillus*, *Clostridium*, *Desulfotomaculum*, *Sporosarcina*, *Sporolactobacillus* nemzetségeknél. Morfológiai szempontból az ezekbe a nemzetségekbe tartozó fajok nagy része bacilus (kivételek a *Sporosarcina* nemzetség, amelyet kokkuszos képviselnek).

A *Rhodocyclidium vannielli* fotoszintetizáló bíborszínű nem-kénbaktériumnál, valamint a *Methylosinus* nemzetségbe tartozó fajoknál exospórákat mutattak

ki, amelyek ellenállók a meleggel és a szárazsággal szemben, de különböznek az endospórától kémiai összetételük, szerkezeti jellegzetességeik és a képződés módja szempontjából.

A baktériumok spóráképzése egy túlélési mechanizmus kedvezőtlen környezeti feltételek között. A spóráképzés a baktériumoknál nem egy szaporodási forma, mint a növényeknél és a gombáknál, mert mindegyik baktériumsejt csak egy spórát képez, amely kicsírázva végül egy vegetatív sejtet hoz létre.

Az endospóra képződése sejtosztódásként indul, megkettőződik a DNS, de a sejt kettéosztódása nem történik meg. A sejtmembrán betüremkedik és körbezárja a DNS-t, és így az anyasejten belül elkülönül a spóra protoplasztja, amely körül kialakul egy többrétegű, nagyon ellenálló spórafal.

A spórák alakja és elhelyezkedése a vegetatív sejt belsejében nagy jelentőségű a mikroorganizmusok meghatározása és osztályozása szempontjából. A spóra lehet gömb vagy tojásdad alakú, lehet központi, terminális és szubterminális helyzetű.

A spóra átmérője lehet kisebb vagy nagyobb, mint a baktériumsejt keresztmetszeti átmérője. Ennek alapján vannak olyan spórák, amelyek nem változtatják meg a sejt alakját, mivel keresztmetszeti átmérőjük nem nagyobb, mint a sejt átmérője. Ez jellemző a *Bacillus* nemzetségre, ahol a spóra lehet központi (*Bacillus anthracis*), szubterminális (*Bacillus cereus*) és terminális helyzetű (*Bacillus subtilis*). A *Bacillus subtilis* esetében a spóra mindhárom helyzete előfordul.

Más spóráknak nagyobb az átmérőjük, mint a sejt átmérője, és ennek következtében a baktériumsejt deformálódik. Ez pedig a *Clostridium* nemzetségre jellemző, ahol a spóra lehet központi (*Clostridium pasteurianum*), szubterminális (*Clostridium sporogenes*) és terminális helyzetű (*Clostridium tetani*).

A spóráképző baktériumok között vannak patogének is, amelyek toxintermelésük miatt súlyos betegségeket okozhatnak, mint például: *Bacillus anthracis* (a lépfene vagy anthrax kórokozója), *Bacillus cereus* (hasmenéssel vagy hányással járó élelmiszer-megbetegedést okoz), *Clostridium botulinum* (a kolbázmérgezés vagy botulizmus kiváltója), *Clostridium perfringens* (hasmenéssel járó bélgyulladás, gázgangréna), *Clostridium tetani* (merevgörcs vagy tetánusz okozója).

2. Spórafestés

A Schaeffer és Fulton által 1933-ban leírt festési eljárást az endospórák kimutatására és a vegetatív sejtektől való elkülönítésükre használják. A kettős festés során elsőként malachitzölddel, majd ezt követően safraninnal történik a festés. A vegyi úton előállított malachitzöld festék nevét onnan kapta, hogy színe hasonlít a szép zöld színű, réztartalmú, féldrágakőként ismert malachit ásványhoz. Kémiai képlete (IUPAC): $C_{23}H_{25}ClN_2$, 4-[(4-dimetilaminofenil)-fenil-metil]-N,N-dimetil-anilin. Híg vizes oldatát akvárium fertőtlenítőszerként is használják a halak és ikráik parazitás, gombás és bakteriális megbetegedései ellen.

A spórafestés első lépéseként malachitzöldet használnak. Mivel az endospórát körülvevő spórafalnak van egy keratinszerű fehérjéből álló, festésálló rétege, a malachitzöld bejuttatása a spóra belsejébe forralással történik (agresszív festési eljárás). A bázikus színezőanyagokhoz tartozó malachitzöld színes, ún. kromofór csoportja pozitív töltésű (kation jellegű), így az endospórába bejutva a malachitzöld a spóra savas jellegű alkotórészeihez, a nukleinsavakhoz és fehérjékhez kötődik, egyenletesen megfestve a spórát. A festést követő, vízzel történő öblítéskor a malachitzöld nem mosódik ki a spórából. A malachitzöld az endospórával nem rendelkező vegetatív sejtet is megfesti, de a zöld festék az öblítés során kimosódik, így a vegetatív sejtek elszíntelenednek.

A második, safraninnal történő festés szerepe, hogy a vegetatív sejtek rózsaszínűre festődjenek és ezáltal láthatóvá váljanak. A safranin (akárcsak a malachitzöld) a bázikus színezőanyagokhoz tartozik, és a nukleinsavakhoz és fehérjékhez kötődve egyenletesen megfesti a vegetatív sejtet. A szobahőmérsékleten alkalmazott safranin festék nincs hatással az endospórákra, mivel nem jut be ezek belsejébe, így azok továbbra is megőrzik korábbi zöld színüket.

A gyakorlat menete:

A gyakorlat során vizsgált baktérium az élelmiszer-mérgezést okozó *Bacillus cereus*. Elvégzendő feladatok:

- kenetkészítés;
- szárítás levegőn;
- rögzítés lángnál;
- festés két lépésben:

1. lépés: festés malachitzölddel

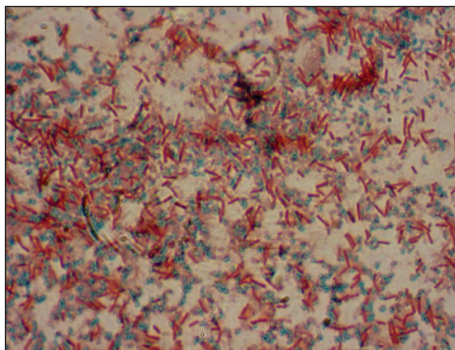
- a kenetre vékony szűrőpapírcsíkot teszünk, majd malachitzöld oldatot csepegtetünk rá;
- a tárgylemezt alulról gázégő lángjával 1-2 percre melegítjük, míg 3-4 alkalommal gőzt bocsát ki; ha szükséges, a festékoldatot pótolni kell;
- a kenetet hagyjuk kihűlni;
- lemosás csapvízzel;

2. lépés: festés safraninnal vagy fukszinnal 1 percre

- lemosás csapvízzel;
- szárítás levegőn;
 - mikroszkópos vizsgálat (100x objektívvel).

Értékelés:

A mikroszkópi vizsgálat során megfigyelhető, hogy a vegetatív sejtek vörösré, a különálló spórák pedig zöldre festődnek (10. ábra). Találhatunk olyan vegetatív sejteket is, amelyekben benne van a spóra.



10. ábra. *Mikroszkópi preparátum vegetatív sejtekkel és spórákkal*

5. ÉLŐSEJTSZÁM-MEGHATÁROZÁS TENYÉSZTÉSES MÓDSZEREKKEL

A laborgyakorlat célja:

Az élelmiszer-mikrobiológiában a vizsgált élelmiszerminták élőcsíraszám-meghatározása céljából alkalmazott szabványos módszerek elsajátítása.

Elméleti háttér:

A gyakorlatban legtöbbször a tenyésztéses élőcsíraszám-meghatározási módszereket alkalmazzák, mivel elsősorban az élő, szaporodni képes (hasznos vagy káros változást előidéző) mikroorganizmusok számának a kimutatása a fontos. Az erre a célra általánosan használt módszerek a határhígításos, a lemezöntéses és a szélesztéses élősejtszám-meghatározások.

A határhígításos módszer esetében a sejtszámot nem közvetlenül olvassuk le, hanem statisztikai alapon számítjuk ki, és a tenyésztést folyékony tápközegben végezzük. Lemezöntés és szélesztés esetén a tenyésztés szilárd táptalajon vagy táptalajban történik, a kifejlődő mikroorganizmus-telepek közvetlenül megszámlálhatók. Mivel szilárd táptalajon akkor is egyetlen telep fejlődik ki, ha több sejt összetapad, vagy a sejtek láncot vagy sejthalmazokat képeznek, ezért a kinőtt telepek száma nem mindig egyezik meg a táptalajra leoltott szuszpenzió sejtszámával. Ezt fejezi ki a telepképző egység (TKE) elnevezés.

A vizsgálandó anyagból szuszpenziót készítünk, amit fokozatosan addig hígítunk, amíg az élő sejtek száma a tenyésztés után értékelhetővé válik. A hígítási sor első tagja az alaphígítás (törzsszuszpénzió). Folyékony élelmiszerek (pl. víz, must, bor, tej, gyümölcsle) esetén ennek elkészítése nem szükséges: a vizsgálandó anyag megfelelő mennyiségű és aszeptikus körülmények között vett mintája szolgál a hígítási sor első tagjául. Vízzel elegyedő vagy vízben oldódó anyagok mintáiból ismert mennyiséget mérhetünk hígítófolyadékba az alaphígítás elkészítése céljából. Szilárd anyagokat aprítani és egyneműsíteni kell a szuszpenzió elkészítéséhez. Az egyneműsítéshez legcélszerűbb homogenizáló készüléket használni.

A hígítófolyadék steril élettani (fiziológiás) sóoldat (0,9% NaCl) vagy peptonvíz (0,1% pepton, pH=7,0) lehet. Leggyakrabban 10 ml (vagy gramm) mintát adunk 90 ml hígítófolyadékhoz.

Az alaphígításból többnyire tízszeres hígítási léptékkel készítjük a hígítási sor további tagjait. A hígítások elkészítésekor minden lépésnél új, steril pipettahegyet használunk. Ügyelni kell a pipettázás pontosságára, továbbá az aszeptikus munkára.

A mezofil aerob mikrobák száma adja az egyik leghasznosabb tájékoztatást az élelmiszer mikrobiológiai állapotáról. Ebben a mikrobaszámban tükröződik a nyersanyag, a feldolgozási mód vagy a késztermék mikrobiológiai-higiéniai minősége.

A nagy élősejtszám gyakran azt jelzi, hogy a nyersanyag már nem friss, erősen szennyezett volt, vagy a technológiában nem tartották be az előírt hőmérséklet, idő- és más értékeket, vagy a feldolgozás elhanyagolt higiéniai körülmények között folyt. A mezofil aerob mikrobaszám bizonyos esetekben az egészségügyi minőség megítélésére is alkalmas, főleg olyan élelmiszereknél, amelyekben normális tárolási körülmények között a mikroorganizmusok nem szaporodhatnak (pl. szárítmányok, fagyasztott termék).

5.1. Határhígításos élősejtszám-meghatározás (MPN-módszer)

Elméleti háttér:

A módszerrel a milliliterenkénti legvalószínűbb élőcsíraszámot (Most Probable Number, MPN) határozzuk meg. A vizsgált anyag alapszuszpenzióját addig hígítjuk, míg az utolsó hígítás 1 ml-ében már feltehetően nincs élő sejt. A hígításokból több párhuzamos leoltást végzünk folyékony tápoldatba, és a szaporodást mutató kémcsövek számából matematikai (statisztikai) alapon készült táblázatok (Hoskins-féle táblázat) segítségével meghatározzuk a legvalószínűbb élősejtszámot.

A megkívánt pontosságtól függően hígításonként 3-3, 4-4 vagy 5-5 párhuzamos leoltást végzünk. Általában 1 ml-t oltunk be folyékony táptalajba. Az előírt tenyésztési idő eltelte után a szaporodást mutató kémcsövek számának és hígítási szintjének ismeretében a Hoskins-féle táblázatokból a kulcsszám segítségével meghatározzuk a legvalószínűbb élősejtszámot (1. táblázat).

A kulcsszám az a háromjegyű szám, amelynek első számjegye azt mutatja, hogy hány kémcső pozitív abban a legnagyobb hígításban, amely még maximális számú pozitív kémcsövet eredményezett (például ha 3 párhuzamos leoltást végeztünk, akkor lehetőleg 3). A második számjegy az ezután következő hígítási lépcsőben talált pozitív kémcsövek számát adja meg. A harmadik számjegy pedig a következő nagyobb hígítás pozitív kémcsöveinek számára utal. A legvalószínűbb élőcsíraszámot a táblázatból a kulcsszám alapján kikereshető alapérték segítségével úgy kapjuk meg, hogy az alapérték számjegyét megszorozzuk a kulcsszám első számjegyéhez tartozó hígítási fokkal. A leggyakrabban alkalmazott a hígításonkénti 3-3 párhuzamos leoltás.

1. táblázat. *Hoskins-féle táblázat a milliliterenkénti legvalószínűbb elősejtszám meghatározásához, hígításonként 3-3 leoltás esetén*

Kulcsszám	Kulcsszámnak megfelelő alapérték	Kulcsszám	Kulcsszámnak megfelelő alapérték
000	–	200	0,91
001	0,3	201	1,4
002	0,6	202	2,0
003	0,9	203	2,6
010	0,3	210	1,5
011	0,61	211	2,0
012	0,92	212	2,7
013	1,2	213	3,4
020	0,62	220	2,1
021	0,93	221	2,8
022	1,2	222	3,5
023	1,6	223	4,2
030	0,94	230	2,9
031	1,3	231	3,6
032	1,6	232	4,4
033	1,9	233	5,3
100	0,36	300	2,3
101	0,72	301	3,9
102	1,1	302	6,4
103	1,5	303	9,5
110	0,73	310	4,3
111	1,1	311	7,5
112	1,5	312	12,0
113	1,9	313	16,0
120	1,1	320	9,3
121	1,5	321	15,0
122	2,0	322	21,0
123	2,4	323	29,0
130	1,6	330	24,0
131	2,0	331	46,0
132	2,4	332	110,0
133	2,9	333	–

5.1.1. Fagyasztott zöldség mezofil aerob sejtszámának a meghatározása MPN-módszerrel

A gyakorlat menete:

Sterilen kimérünk 10 g-ot a vizsgált fagyasztott zöldségmintából és 90 ml hígítófolyadékba helyezzük, majd megfelelően homogénezzük. Ezt követően hígítási sort készítünk 10^5 hígításig. Minden hígításból 3-3 párhuzamban, 1-1 ml-t oltunk pipettával 9 ml Nutrient tápoldatot tartalmazó kémcsövekbe. Inkubálás $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on 48 óráig történik.

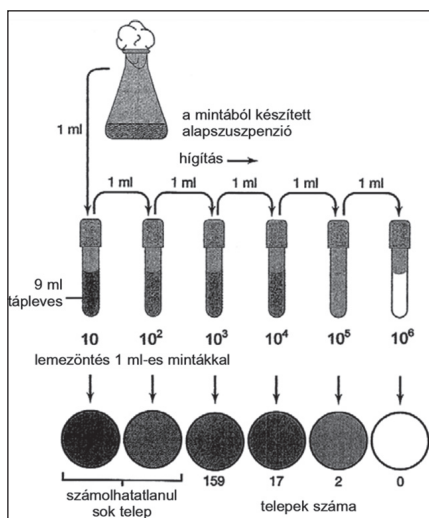
Értékelés:

Figyeljük meg az egyes hígítások esetében a szaporodást mutató és a sterilen maradt kémcsöveket. A kapott eredmények alapján megadjuk a kulcsszámot, a Hoskins-féle táblázatból kikeressük a kulcsszámnak megfelelő alapértéket, és végül meghatározzuk az 1 ml-ben lévő sejtszámot.

5.2. Lemezöntéses élősejtszám-meghatározás

Elméleti háttér:

A vizsgálandó anyagból alapsuszpenziót, illetve hígítási sort készítünk. A megfelelő hígításokból az előre előkészített és feliratozott Petri-csészékbe 1-1 ml-t pipettá-



11. ábra. A lemezöntéses élősejtszám-meghatározás vázlatos ábrázolása

(https://www.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop425/2011_0001_521_Elelmiszer-mikrobiologia/ch10.html)

zunk. Ezután a sterilizett, majd 45-50 °C-ra visszahűtött agaros táptalajból 15-15 ml-t öntünk minden Petri-csészébe. Ezt a hőmérsékletet a mikroorganizmusok pár percen keresztül még károsodás nélkül elviselik. Óvatos körkörös mozzgatással elkeverjük az 1 ml-nyi inokulumot a táptalajban, majd hagyjuk megszilárdulni. Megszilárdulás után a Petri-csészét felfordítjuk, ezután inkubátorba helyezzük, és az előírt hőmérsékleten és ideig kitenyésztjük a mikrobákat. Értékelésnél lehetőleg azokat a Petri-csészéket vegyük figyelembe, amelyeken a telepszám 30 és 300 közé esik (30 alatt a relatív hiba erősen megnő, amíg 300 felett nagyon nehéz a számlálás) (11. ábra).

5.2.1. Fűszerpaprika mezofil aerob mikrobaszámának a meghatározása lemezöntéssel

A gyakorlat menete:

Kimérünk 10 g fűszerpaprikát a frissen felnyitott tasakból, 90 ml hígítófolyadékot tartalmazó lombikba öntjük és megfelelően homogénezzük. Hígítási sort készítünk (10^6 -ig) (12. ábra). Steril pipettával a legnagyobb hígítás felől indulva 1-1 ml mennyiségeket mérünk két párhuzamban Petri-csészékbe. 15-15 ml 45 °C-ra visszahűtött Nutrient táptalajt töltünk a Petri-csészékbe, majd alaposan elkeverjük. Megszilárdulás után felfordított állapotban 48 óráig inkubáljuk 37 °C-on.



12. ábra. Fűszerpaprika-mintából készített alapsuszpenzió és hígítási sor

Eredmények és értékelés:

Az azonos hígításhoz tartozó, 30-300 közötti számban telepet tartalmazó Petri-csészékben megszámoljuk a telepképzők számát, átlagoljuk, és a hígítási fok figyelembevételével megadjuk a paprikaőrlemény mezofil aerob sejt számát (db/g vagy TKE/g).

5.3. Élősejtszám-meghatározás szélesztéssel

Elméleti háttér:

Az elkészített táptalajt steril Petri-csészékbe öntjük és hagyjuk megszilárdulni. A vizsgálandó anyagból törzsszuspenziót, majd hígítási sort készítünk 10^4 hígításig. Minden hígításból 2-2 párhuzamban 0,1 ml-nyi mennyiségeket pipetázunk a Petri-csészékben levő táptalajok felületére. Ez további 10-szeres hígítást jelent, mert a sejtszámot 1 ml-re szoktuk megadni. A szuszpenziót steril hajlított üvegbottal (szélesztőt) egyenletesen elkenjük a táptalaj felületén. Ezt követi az inkubálás az előírt hőmérsékleten és megfelelő ideig. Inkubálás után a telepszámok alapján kiszámítjuk az eredeti minta milliliterenkénti élősejtszámát.

Értékelés:

Megszámoljuk a telepeket azokon a lemezeken, ahol már külön álló telepek fejlődtek, és meghatározzuk az 1 ml mintának megfelelő élősejtszámot, figyelembe véve a hígítást és azt, hogy a táptalaj felületére 0,1 ml mintát szélesztettünk.

5.3.1. Fűszerbors mezofil aerob mikrobaszámának meghatározása szélesztéssel

A gyakorlat menete:

Kimérünk 10 g fűszerborsmintát, és 90 ml steril hígítófolyadékot tartalmazó lombikba tesszük. Alapos összerázás után hígítási sort készítünk (10^4 -ig). A hígításokból 2-2 párhuzamban 0,1 ml-t pipetázunk a tápagarlemezekre, és alkoholba mártott, leégetett, majd visszahűtött szélesztőt egyenletesen elszélesztjük. Nagyon fontos az egyenletes szétkenés, mert a számlálhatóság ettől függ a későbbiekben. Az inkubálás 48 óráig tart $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on.

Eredmények és értékelés:

Az azonos hígításhoz tartozó, 30-300 közötti számban telepet képezett Petri-csészékben megszámloljuk a telepképzők számát, átlagoljuk, és a hígítási fok, valamint a 0,1 ml beméréséből eredő 10-es szorzófaktor figyelembevételével megadjuk a fűszerbors mezofil aerob sejtszámát (db/g vagy TKE/g).

6. SPÓRÁS BAKTÉRIUMOK SZÁMÁNAK MEGHATÁROZÁSA

6.1. Szárítmányok aerob spórás baktériumszámának a meghatározása. A *Bacillus cereus* jelenlétének kimutatása szelektív táptalajon

A laborgyakorlat célja:

Az aerob és anaerob spórás baktériumok élelmiszerekben való előfordulási következményeinek megértése, a szennyeződési források megismerése és a kimutatási módszerek alkalmazása.

Elméleti háttér:

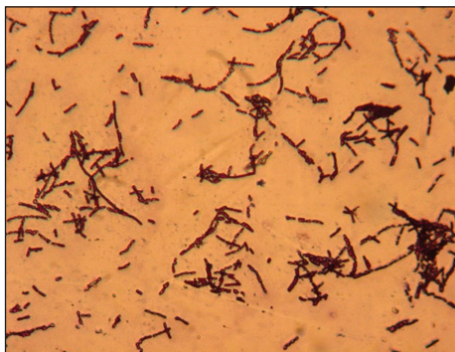
A konzervek gyártásánál, gyümölcs- és zöldségszárítmányok készítésénél alkalmazott különböző hőkezelési eljárások (pl. sterilizálás, pasztörizálás, szárítás) hatására a vegetatív baktériumsejtek jelentős része általában elpusztul, a spórás baktériumok azonban megőrizhetik életképességüket. Az aerob mezofil spóraszám felvilágosítást ad a hőkezelés elégtelenségéről, vagy főzött, pasztörizált termékeknél a várható romlásról. Az aerob spórás baktériumok az általános szennyezettséget jelző indikátor mikroorganizmusok csoportjába tartoznak.

A spórás baktériumok kimutatásának elve azon alapszik, hogy a vizsgált terméket 10-15 percig 80 °C-on kezeljük, melynek hatására elpusztulnak a vegetatív sejtek, majd a spórás baktériumokat optimális körülmények közé helyezve (tápközeg, hőmérséklet) kitenyésztjük, és számukat az élősejtszám-meghatározási módszerek valamelyikével meghatározzuk.

Élelmiszeripari szempontból a spórás baktériumok elsősorban a hőkezeléssel tartósított készítményekben mint romlást okozók jönnek tekintetbe. A mezofil *Bacillus* fajok többsége 20-40 °C hőmérsékleten, valamint pH = 5–9 között jól szaporodik. A *Bacillus*ok elsődleges élőhelye a talaj, ahonnan a spórák a levegőbe kerülve szétterjednek, és környezetünkben mindenhol előfordulnak. Gyakran megtalálhatók a különféle élelmiszerekben: zöldségeken, gabonán, szárítványokon, fűszereken, tejporban. A nagy mezofil aerob spóraszámú fűszerek és adalékanyagok romlást okozhatnak az enyhén hőkezelt késztermékekben (például húskészítményekben) is. Ritkán konzervek romlását is okozzák, ha a pH 4,5-nél nagyobb.

A *Bacillus cereus* baktérium talajlakó, spórái élelmiszerekben és adalékanyagokban kis számban gyakran megtalálhatók (13. ábra). Előfordul gabonaféléken, szárítványokban, fűszerekben, tejtermékekben (túléli a pasztörizációt), keményítőtartalmú termékekben. Feltételesen kórokozó, az infektív dózis 10^5 sejt vagy

spóra/g. Élelmiszer-mérgezést okoz, hányásos vagy hasmenéses típusú tünetekkel. Előfordulhat, hogy a *Bacillus cereus* törzs mindkét enterotoxint termeli, és el-
árasztja vele az élelmiszert. Ez esetben erős hányás és gyenge hasmenés együttesen
jelentkezhethet. Különféle gabonák és rizs felületen konyhatechnikai feldolgozása és
szobahőmérsékleten való tárolása, akár köretként vagy töltelékként, lehetőséget
nyújt a *B. cereus* spórák kicsírázására, a baktériumok elszaporodására és az en-
terotoxinok nagy mennyiségű kiválasztására az ételbe. A *Bacillus cereus*, mivel
obligát aerob baktérium, a bélcsatornában nem szaporodik, itt már nem termel
enterotoxinokat. Ételmérgezést a táplálékban már benne lévő, korábban termelt
enterotoxinjaival okoz.



13. ábra. A *Bacillus cereus* baktérium mikroszkópi képe

A zöldségszárítmányok gyártása során alkalmazott előfőzés célja elsősorban az enzimek inaktiválása, valamint jelentős sejtszámcsökkentő hatása is lehet. Az előfőzés nem pusztítja el a spórákat, ezért *Bacillusok*, termofil spóráképzők és szulfitredukáló *Clostridiumok* gyakran kimutathatók a zöldségszárítmányokból. A zöldségféléket általában forró levegővel szárítják. A víz párolgása következtében a termék belsejének hőmérséklete 45 °C alatt marad, annak ellenére, hogy a szárítólevegő hőmérséklete 80-100 °C-os. Ezért a szárítás alatt nem következik be jelentős mikrobaszám-csökkenés. A termék nem megfelelő (egyenetlen) elhelyezése a szárítóalácán vagy a szállítószalagon helyenként nedvesebb zónákat hoz létre, ami szintén kedvez a mikroorganizmusok szaporodásának.

A zöldségszárítmányok kis vízakтивitásuknak köszönhetően romlásmentesen eltartható termékeknek tekinthetők. Tárolás közben a hőmérséklet-ingadozás hatására a csomagolt termékekben vízvándorlás és kondenzvízképződés következhet be, ami a túlélő mikrobák számára kedvező életfeltételt jelenthet. A szárítványok visszanedvesítése vagy nagy vízakтивitású készételekhez való felhasználása mikrobiológiai szempontból kedvezőtlen. A szárítványok maradék mikrobiótája főleg baktériumspórákból és penészgombaspórákból áll. Viszonylag kis nedvességtar-

talomnál ($0,85-0,93 a_w$ értéknél) a penészgombák szaporodnak el, a jobban viszszanedvesített ($a_w > 0,96$) szárítmányokban a baktériumspórák is kicsírázhatnak.

A *Bacillus cereus*, a *Clostridium botulinum* és a *C. perfringens* baktériumok spóráinak jelenléte talaj eredetű szennyeződésként lehetnek jelen a terméken.

A gyakorlat menete:

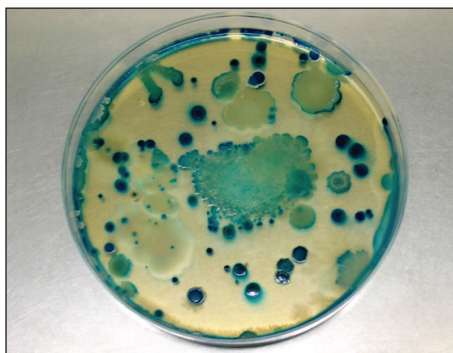
Kimérünk 1 g zöldégszárítmányt és 9 ml hígítófolyadékot tartalmazó kémcsőbe öntjük. Ezután 4-5 percig kémcsőkeverő segítségével szuszpendáljuk. Utána $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os vízfürdőbe helyezzük 15 percre. Hőkezelés után óvatosan hűtsük le csapvízzel, majd készítsünk hígítási sort (10^3 -ig), amelyekből hígításonként 2 párhuzamban 1-1 ml-t pipetázunk a steril Petri-csészékbe. Ezt követi a lemezöntés Nutrient táptalajjal, majd a táptalaj megszilárdulása után a 48 óráig tartó inkubálás $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on.

A hőkezelt alapszuszenzióból és az abból készült hígításokból 0,1 ml-t pipetázunk *Bacillus cereus* kimutatására alkalmas szelektív táptalajt tartalmazó Petri-csészékbe, és steril szélesztőbot segítségével szétszélesztjük a táptalaj felületére. Ezt követi az inkubálás 48 óráig $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on.

Eredmények és értékelés:

A szélesztés esetén alkalmazható telepszámlálási szabályokat figyelembe véve meghatározzuk a vizsgált szárítmányban kimutatható mezofil aerob spórás baktériumok számát.

Az alkalmazott szelektív táptalajnak megfelelően megfigyeljük a *Bacillus cereus* baktériumra jellemző telepeket, majd meghatározzuk a telepképző egységek számát a szélesztésnek megfelelő élősejtszám-meghatározással. Például a ChromoBio Cereus Base szelektív táptalaj esetében a *B. cereus* baktériumtelepek kék színűek áttetsző széllel (14. ábra). Ezen a táptalajon kifejlődhetnek a *B. subtilis* baktérium telepei is, melyek szintén kék színűek, de a telep széle nem áttetsző.



14. ábra. Aerob spórás baktériumok telepei szelektív táptalajon

A kapott eredmények alapján következtetéseket vonunk le a vizsgált termék minőségére vonatkozóan, a romlást okozó vagy az esetleges feltételesen kórokozó baktériumok jelenléte vagy hiánya alapján.

6.2. Anaerob spórás baktériumok számának a meghatározása őrölt borsból és fűszerpaprikából

A laborgyakorlat célja:

Az adalékanyagok a húskészítmények szennyező mikrobiótájának gyakori forrásai. A gyakorlat során fűszerekben (bors, paprika) található anaerob spórás baktériumok számát határozzuk meg.

Elméleti háttér:

A *Clostridium*ok igen elterjedtek a természetben, talajban, vízi üledékekben. Spóráik túlélnek az oxigén hatását, a kiszáradást és a magas hőmérsékletet, majd kedvező feltételek között, alkalmas tápanyagok jelenlétében kicsíráznak és elszaporodnak. Vannak köztük szénhidrátbontók, fehérjebontók, szénhidrát- és fehérjebontók, valamint specializált tápanyag-hasznosítók. Előfordulnak termofil és pszichofil képviselők is. Ezen tulajdonságaik alapján ezek az anaerob spórás baktériumok, ellenállva a feldolgozó és tartósító műveleteknek, az élelmiszerek jelentős romlást okozó tényezői. Számos *Clostridium* patogén, amelyek a termelt toxinok által különféle megbetegedéseket okoznak. Ezek közül a legjelentősebb fajok a *Clostridium botulinum* és a *C. perfringens*. A fekális szennyeződés által előfordulhatnak zöldségeken, fűszereken, a húsban és a tejben, valamint az ezekből készült termékekben.

A mezofil *Clostridium*ok szaporodásának hőmérsékleti tartománya 10–50 °C, pH-tartománya 5–9 közötti. Romlást okozó, főként rothasztó anaerob baktériumok. A fehérjék, peptidek, aminosavak erjesztésével kellemetlen szagú termékeket (merkaptán, putreszcín, kadaverin) és gázokat (H_2S , NH_3 , CO_2 , H_2) képeznek. Ilyen fajok például a *Clostridium bifermentans*, *C. putrefaciens*, *C. histolyticum*.

Az anaerob mezofil baktériumszám kimutatásával az ételmérgezést okozó anaerob *Clostridium*ok számára, illetve jelenlétére következtethetünk.

A gyakorlat menete:

A vizsgálandó fűszerből kimérünk 10 g-ot és hozzáadjuk 90 ml hígítófolyadékhoz. Alapos összerázás után ebből az első hígításból további hígításokat készítünk a 9 ml hígítófolyadékot tartalmazó kémcsövekben, a 6. hígítási szintig. Minden hígításból 1-1 ml-t pipetázunk 3 párhuzamban a tioglikolátos tápfolyadékot és paraffint tartalmazó kémcsövekbe. A kémcsöveket 15 percre 80 °C-os vízfürdőbe állítjuk. Ez idő alatt a paraffinréteg megolvad és a felszínre emelke-

dik. A vegetatív sejtek elpusztulnak. Hőkezelés után a kémcsöveket hideg vízben gyorsan visszahűtjük, ekkor a paraffinréteg megdermed és elzárja az oxigén be- diffundálásának a lehetőségét. A kémcsöveket 3-4 napra 37 °C-os hőmérsékletre beállított termosztátba helyezzük.

Az anaerob spórás baktériumok számának meghatározását végezhetjük szélesztéssel is, amikor a megfelelő hígításokból 0,1 ml-t szélesztünk tioglikolátos táptalaj felületére steril szélesztőbot segítségével. Az inkubálás ez esetben anaerob körülményeket biztosító dobozban történik 3-4 napig 37 °C hőmérsékleten (15. ábra).



15. ábra. *Baktériumok tenyésztése anaerob dobozban*

Eredmények és értékelés:

A pozitív eredményt mutató kémcsövek (zavarosodás és gáztermelés, amit a paraffindugó felemelkedése jelez) száma alapján Hoskins-táblázat segítségével határozzuk meg a fűszer 1 g-jában levő anaerob spórás baktériumok legvalószínűbb sejtszámát.

Szilárd táptalajon történő tenyésztés esetén a szélesztéssel történő elősejtszám-meghatározásos módszernek megfelelően adjuk meg a csíraszámot.

7. MIKROSZKOPIKUS GOMBÁK KIMUTATÁSA ÉS VIZSGÁLATA KÜLÖNFÉLE ÉLELMISZEREKBŐL

7.1. Élesztőgombák kimutatása és vizsgálata

A laborgyakorlat célja:

Az élelmiszeripari szempontból jelentős élesztőgombák vizsgálata mikroszkópi preparátumok segítségével, izolálásuk különféle növényi anyagokról, valamint a higiéniai indikátorok és romlást okozók jelenlétének a kimutatása.

Elméleti háttér:

Az élesztőgombák egysejtű eukarióta szervezetek. Az élesztőknek köszönhető a kenyér kelesztése, a sör és a bor erjesztése és sok más anyagcseretermék ipari termelése. Az élesztők a természetben elterjedtek, főként a növényeken, néhány faj a talajban fordul elő, mások az állati szervezetekben vagy rovarokkal társulva él. Kevés kórokozó fajuk ismert. Vegetatív szaporodásuk általában sarjadzással történik, mely folyamat során számtartó osztódással a sejtmag kettéosztódik, és egyik fele, a citoplazma és egyes sejtalkotók egy kis részével együtt, az anyasejtből kidudorodó sarjsejtbe vándorol. A sarjsejt lefűződik, és a populáció egyedeként önálló életet kezd. Az élesztősejtek alakja többnyire gömb, ovális vagy hengeres, de a sejtek meg is nyúlhatnak és álhifák képződését mutatják. A fonalas és sarjadzó sejt alakot váltogatni képes gombákat dimorf gombáknak nevezik. A sejtalkalak megváltozását általában a környezet oxigén és/vagy szén-dioxid-tartalma, a hasznosítható szénhidráttartalom és más környezeti tényezők váltják ki.

Az élesztőgombák heterotróf aerob szervezetek, a fakultatív anaerob fajok jellegzetes alkoholos erjesztést végeznek. A glikolízis útján képződött piroszólósav acetaldehiddé dekarboxileződik, majd etilalkohollá redukálódik. Élelmiszerekben általánosan előfordulnak, különösen a cukortartalmú termékekben és olyan élelmiszerekben, amelyek a baktériumok szaporodásának nem kedveznek. Tejtermékekben és húskészítményekben is található néhány élesztőgomba faj.

A *Saccharomyces* az egyik legismertebb és gyakorlati szempontból legfontosabb nemzetség. Idetartoznak az erjedési iparokban és a sütőélesztőként alkalmazott fajok (pl. *S. cerevisiae*, *S. bayanus*, *S. pastorianus*).

A *Dekkera*, a *Debaromyces* és a *Zygosaccharomyces* fajok leggyakrabban spontán erjedésekből izolálhatók. Egyes *Zygosaccharomyces* fajok (pl. *Z. rouxii*, *Z. bailii*, *Z. lentus*) ozmotoleranciájuk, savakkal és tartósítószerrel szembeni ellenállásuk miatt élelmiszerromlást okozó élesztőgombák.

A *Candida* fajok közül egyesek humánpatogének, például a *Candida albicans*, mások élelmiszerromlást okozhatnak. Vannak fajok, amelyek a must spontán erjesztésében vesznek részt 1-2% alkoholtartalmú közegben.

A gyümölcsalapú üdítőitalokban gyakran előfordulnak élesztőgombák. A gyártó üzemben az alap- és segédanyagokban, berendezésekben, tartályokban, palackokban számolni kell a jelenlétükkel. A rovarok az élesztőgombák közvetítői lehetnek. A legtöbb élesztő nem tud szaporodni a gyümölcsleveken, ezért higiéniai indikátornak tekinthetők. Az élesztősejtek hőérzékenyek, és csak kevés éli túl a lékoncentrált vagy a pasztörözést. Az élesztőgomba aszkospórái azonban 10 °C-kal is nagyobb hőmérsékletet is képesek túlélni, mint a vegetatív sejtek. Az élesztők okozta mikrobiológiai romlás megnyilvánulhat gázképzéssel, zavarossággal, hártya vagy üledék képződésével, idegen íz kialakulásával.

Üdítőitalok készítésekor a sűrítmények, szörpök felhígításakor a közeg sok tényezője optimálissá válik az élesztőgombák számára (pl. könnyen asszimilálható szénhidrátok, szükséges nitrogén- és foszfortartalmú vegyületek jelenléte, a pH-érték). A CO₂-nyomás üdítőitalokban alkalmazott nagyságban általában nem okoz számottevő gátlást a fermentatív anyagcserét folytató élesztőgombáknál. Az üdítőitalok romlásának 90%-át élesztőgombák okozzák.

A borkészítésben hasznos szerepet játszó borélesztők elsősorban a *Saccharomyces cerevisiae*, másodsorban a *S. uvarum* fajhoz tartoznak, annak különböző fiziológiai változatát alkotják. A *Zygosaccharomyces* és a *Torulaspora* nemzetséghez tartozó fajok a palackos borok gyakori romlásokozói.

A gyakorlat menete és értékelése:

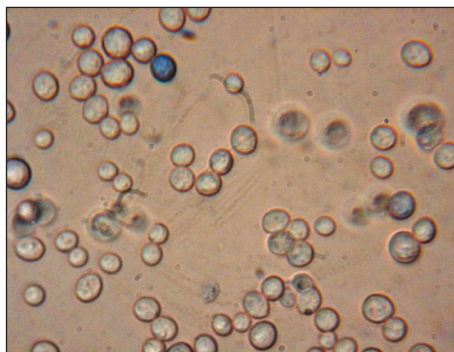
7.1.1. Az élesztőgombák vizsgálata natív preparátum segítségével

Natív mikroszkópi preparátum segítségével megfigyelhetjük az élő élesztőgombasejteket, azok morfológiáját és a sarjadzó sejteket. Erre a célra mintát veszünk olyan élelmiszerekből, melyek az élesztőgombák okozta romlás jeleit mutatják, mint például dzsemekből, befőttekből, gyümölcslevekből. Egy csepp mintát cseppentünk a tárgylemezre és fedőlemezrel lefedjük. Mikroszkóp alatt 40x-es nagyítású objektívvel megvizsgáljuk a preparátumot, és megfigyeljük az élesztőgombákat.

7.1.2. Élesztőgombák vizsgálata élő festett készítményekkel (vitális festés)

Élő sejtek festésére azok a kis koncentrációjú festékkoldatok alkalmasak, amelyek a sejtek membránján áthatolnak. Bejutva a citoplazmába és a különböző sejt-szervecskékbe, megfestik azokat anélkül, hogy a sejtek szerkezetét károsítanák.

A metilénkék festékoldattal történő vitális festés esetén az élettelen és élő sejtek megkülönböztetését az teszi lehetővé, hogy az élő sejt citoplazmájába kevés metilénkék tud behatolni, és a dehidrogenáz enzim hatására az is szintelen leuko-metilénkékké redukálódik. Az elhalt sejtek membránja azonban fokozott mértékben áteresztővé válik a festékkel szemben, ezért a sejtek rövid idő alatt kékre színeződnek (16. ábra). Az élő és elhalt sejtek aránya alapján gyorsan és egyszerűen képet kaphatunk arról, hogy a tenyésztés vagy bizonyos folyamatok (például fermentáció) során hogyan változik a mikroorganizmusok életképessége.



16. ábra. *Saccharomyces cerevisiae* szuszpenzió mikroszkópi képe vitális festés után

A vitális festést két különböző esetben alkalmazzuk. Az egyik esetben különféle, kereskedelembe forgalmazott sütőélesztőkből készítünk szuszpenziót fiziológias sóoldatban, és meghatározzuk az élő és elhalt sejtek arányát. A másik esetben pedig különböző erjedő szőlőmustból veszünk mintát, és elvégezve a vitális festést kimutathatóvá válik az életképes élesztőgombasejtek aránya.

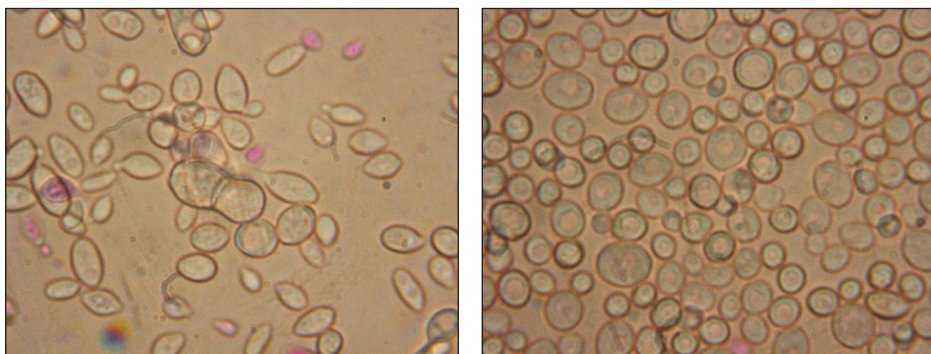
Egy csepp szuszpenziót (mintát) cseppentünk a tárgylemezre, és fedőlemezzel fedjük le. A fedőlemez egyik széléhez helyezünk szűrőpapírcsíkot, az átellenes oldalra pedig kis csepp metilénkék festéket teszünk. Miközben a szűrőpapír szívja a szuszpendáló vizet, helyére metilénkék oldat áramlik a fedőlemez alá. Mikroszkóp alatt 40x-es nagyítású objektívvel megvizsgáljuk a preparátumot. Megfigyeljük a mikroszkópi képen látható sarjadzó és nem sarjadzó élesztőgombasejteket, meghatározzuk 10 látótérben az élő és az elhalt sejtek számát, és megadjuk ezek arányát százalékban.

7.1.3. Élesztőgombák izolálása szelektív táptalajon

Különféle friss gyümölcsök (pl. alma, szilva, szőlő) és zöldségek (pl. saláta, paradicsom, uborka) felületéről származó 10 g mintát adjunk hozzá 90 ml steril hígító-folyadékhoz, és alaposan keverjük össze. Az így kapott alapsuszpenzióból 0,1 ml-t

szélesztünk különféle, a mikroszkopikus gombák kimutatására alkalmas szelektív táptalajok felületére (Hefe-Glucose agar, Rose Bengal agar, komplex táptalaj). Ezt követi az inkubálás 30 °C-on 3-5 napig. Az inkubálást követően megfigyeljük a kifejlődött, az élesztőgombákra jellegzetes vajkonzisztenciájú telepeket, és meghatározzuk a telepképző egységek számát. Natív mikroszkópi preparátum segítségével megfigyeljük az izolált élesztőgombák sejtjeinek morfológiáját (17. ábra).

Az izolált élesztőgombákból tiszta tenyészeteket készítünk, amelyek felhasználhatók további vizsgálatokhoz (például az izolált élesztőgombák alkoholtoleranciájának a kimutatásához; a hőmérséklet, pH, ozmotikus nyomás, tartósítószerrel szembeni tűrőképesség vizsgálatához).



17. ábra. Levelek felületéről izolált élesztőgombák mikroszkópi képe

7.1.4. Élesztőgombák számának meghatározása üdítőitalokból

Különféle gyümölcsalapú üdítőitalokból 10x-es és 100x-os hígításokat végzünk steril fiziológiás sóoldat segítségével, majd ezt követően kioltunk szélesztéssel komplex táptalaj felületére a mintákból, valamint a hígításokból. Ezt követi az inkubálás 30 °C-on 3 napig.

Az inkubálást követően a kifejlődött élesztőgomba-telepek száma alapján megadjuk az élesztőgombák számát, az eredményt 1 liter üdítőital-mennyiségre vonatkoztatva. A kapott eredmények alapján következtetéseket vonhatunk le a vizsgált üdítőital minőségére vonatkozóan. A magas élesztőgombaszám jelzi a nyersanyag gyenge minőségét, valamint a gyártástechnológia során előforduló hiányosságokat. Az élesztőgombaszám meghatározása elvégezhető membránszűrő berendezés segítségével is.

7.2. A mikroszkopikus penészgombák kimutatása és vizsgálata

A laborgyakorlat célja:

Élelmiszereken előforduló penészgombák kimutatása és mikroszkópi vizsgálata, amely fontos az esetleges mikotoxinogén penészgombák beazonosítása szempontjából.

Elméleti háttér:

A mikroszkopikus gombák sejt- és telepmorfológiájukat tekintve igen változatos élőlénycsoportot képviselnek. A legtöbb mikroszkopikus gomba telepet alkot. A gombatelep általában hifákból áll, a gombákra jellemző, fonalas, csőszzerű képződményekből. A hifák gyakran elágaznak, egymással összeköttetéseket létesíthetnek, és így bonyolult hálózatot formálnak, amelyet micéliumnak nevezünk. Mind az ivartalan, mind pedig az ivaros szaporodásuk változatos sejttipusokat foglal magába, és az egyes gombacsoportok morfológiailag és genetikailag jól jellemezhető életciklussal rendelkeznek. A spóráképződést környezeti tényezők indukálják (például a tápanyagforrások kimerülése, a hőmérséklet, a szén-dioxid- és a páratartalom változásai). A penészgombák konídiumai, spórái a levegővel terjednek, így könnyen szennyezhetik az élelmiszerek nyersanyagait és a csomagolatlan késztermékeket.

A penészgombák általában aerob, heterotróf szervezetek. Szénforrásként különböző szerves vegyületeket tudnak hasznosítani, köztük a cellulózt és más összetett szénhidrátokat, valamint a fehérjéket is, mivel sokféle extracelluláris enzimet termelnek. A környezeti tényezők széles határai között tudnak szaporodni. Az oxigénen kívül leginkább a nedvességet igénylik, de többségüknek a szubsztátum néhány százalékos víztartalma, a levegő szokásos páratartalma elegendő. A penészgombák közé számos, igen kis vízaktivitást elviselő faj tartozik (például a *Monascus bisporus*, *Aspergillus glaucus*). A hőmérsékleti igény szerint általában mezofilek, de vannak köztük pszichrofilek is, amelyek a hűtőházban tárolt élelmiszereinken is elszaporodnak (például a *Penicillium expansum*). Kedvelik a savas pH-t, de széles pH-tartományban tudnak szaporodni.

Anyagcsere- és élettani tulajdonságaik alkalmassá teszik a penészgombákat arra, hogy közülük kerüljenek ki a tárolt élelmiszeripari nyersanyagok és a raktározott ipari termékek leghatékonyabb károsítói. Elsősorban gyümölcsök, sütőipari termékek, fűszerek, szárítmányok, szárított gyümölcsök, liszt, cereáliák, dzsemek, mogyoró, egyes tejtermékek és húskészítmények penészedését váltják ki. Az élelmiszerek romlásában főleg három élettani csoport játszik szerepet: a szárazságtűrő, a hidegtűrő és a hőtűrő penészgombák.

Egyes penészgombákat felhasználnak az erjesztett, keményítő alapú élelmiszerek, valamint hús- és tejtermékek előállításánál. Penészgombák fermentációjával antibiotikumokat, egyéb gyógyászati termékeket és szerves savakat, valamint

enzimeket állítanak elő. A penészgombák tevékenysége élelmiszereinken többnyire káros folyamatként, romlásként jelentkezik.

A jelentős gazdasági veszteségen túl számos penészgomba élelmiszer-egészségügyi veszélyt is jelent, toxikus anyagcseretermékeik, a mikotoxinok képzése miatt. A mikotoxinok másodlagos anyagcseretermékek, nincs szerepük a gombák normál anyagcseréjében, azonban szerepet játszanak a gombafajok egymás közti és a baktériumokkal szembeni vetélkedésében. Ezek a másodlagos anyagcseretermékek általában sejtmérgek (citotoxikumok), amelyek az egyes sejtalkotókra (például membránokra) vagy sejtfunkciókra (például fehérje- vagy nukleinsav-szintézis) hatnak.

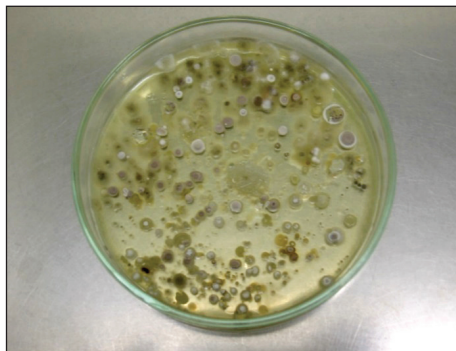
Az ember a mikotoxinokkal többnyire nem közvetlenül, hanem a növényi vagy állati eredetű táplálék szennyezettsége révén találkozik. Az ember egészségre ható leggyakoribb tényezők között a rákkeltő, a fejlődési rendellenességet okozó, a szaporodóképességet csökkentő, az immunszuppresszív és az idegrendszeret károsító hatások említhetők. A mikotoxinok (például aflatoxin, ochratoxin) különös veszélyessége annak tulajdonítható, hogy rendkívül hatékony méreganyagok, igen kis koncentrációkban hatnak, és a kis dózisok hatása kumulálódik. Fontos mikotoxintermelő gombafajok például az *Aspergillus flavus*, *A. ochraceus*, *Penicillium verrucosum*, *P. expansum*, *Fusarium graminearum* és a *F. poae*. Az *Aspergillus* fajok általában tárolt termékeken fordulnak elő, például gabonaféléken, magvakon és fűszereken. A *Penicillium verrucosum* xerofil penészgomba elsősorban a mérsékelt égövben termesztett gabonákon található, de hústermékekből is izolálták. A pszichotróf *P. expansum* fő forrása a romlásban lévő alma és körte. A *Fusarium graminearum* egyike a leggyakoribb növénypatogén penészgombáknak. A *Fusarium poae* elterjedt búzán, kukoricán és árpan. Az élelmiszerekben más toxikus gombák is elterjedtek, mint például a *Cladosporium*, a *Mucor* és a *Stachybotrys*.

A gyakorlat menete és az eredmények értékelése:

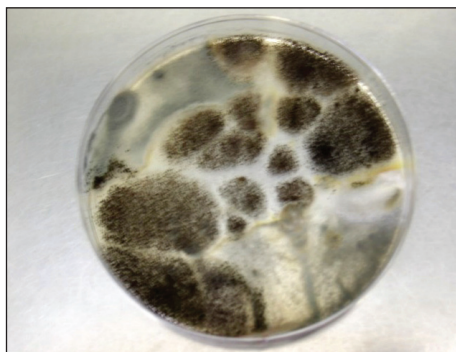
7.2.1. Penészgombák kimutatása fűszerekből és lisztből

A frissen kinyitott tasakból lelángolt vegyszerkanállal kimérünk 10 g-ot a vizsgált fűszerből (például fűszerpaprika) és 90 ml hígítófolyadékba helyezzük, majd alaposan összekeverjük. Hígítási sort készítünk 10^{-6} hígításig, amelyből hígításonként 2 párhuzamban 0,1 ml mennyiséget pipettázunk Czapek Dox táptalaj felületére, majd alkoholba mártott, leégetett és lehűtött üveg szélesztőbot segítségével egyenletesen szétkenjük a táptalaj felületén. Inkubálás 28 °C-on 3-5 napig. Ezt a munkamenetet megismételjük a vizsgált lisztminták esetében is.

Az inkubálást követően a szelektív táptalajon könnyen felismerhetők a jellegzetes penészgomba telepek és egyszerűen megállapítható az 1 g mintában levő számuk (18. ábra, 19. ábra). A penészgombaszám meghatározásánál ne feledjük figyelembe venni, hogy a hígításokból 0,1 ml-eket szélesztettünk.



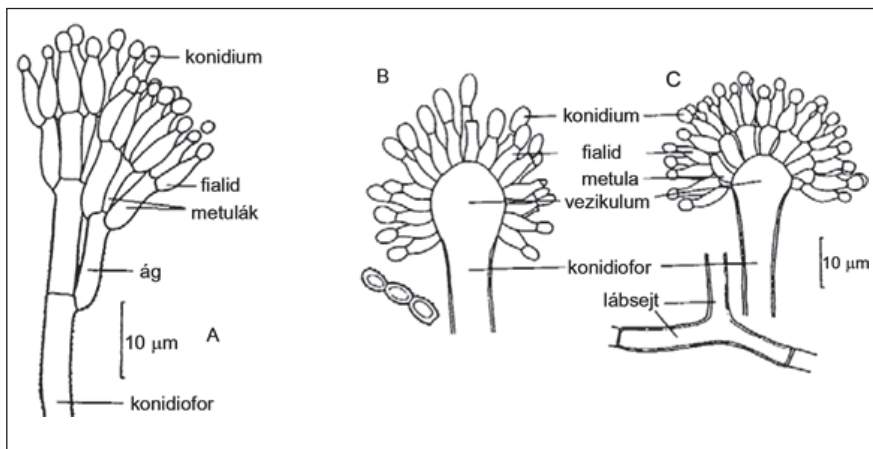
18. ábra. *Fűszerpaprika-mintából kifejlődött penészgombatelepek*



19. ábra. *Provence fűszerkeverékből kifejlődött penészgombák
Czapek Dox táptalajon*

7.2.2. A penészgombák mikroszkópos vizsgálata

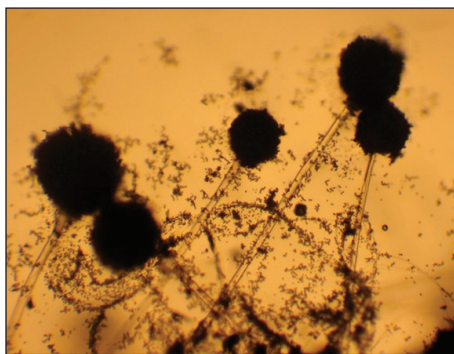
A vizsgált mintákból kifejlődött penészgombatelepekből natív mikroszkópi preparátumokat készítettünk és megvizsgáljuk mikroszkóppal. A sejt- és telepmorfológiai tulajdonságok, valamint a konídiumok elhelyezkedése (20. ábra), elrendeződése alapján határozókönyv segítségével megpróbáljuk megállapítani a vizsgált penészgomba rendszertani besorolását (21. ábra, 22. ábra, 23. ábra). A kapott eredmény alapján következtethetünk a termék esetleges mikotoxinnal való szennyeződésére is.



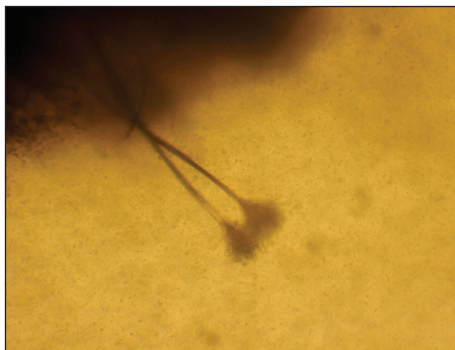
20. ábra. A *Penicillium* és az *Aspergillus* nemzetségbe tartozó penészgombák jellegzetes konídiumfejének szerkezete

A) *Penicillium chrysogenum* (többszörösen elágazó ecset),

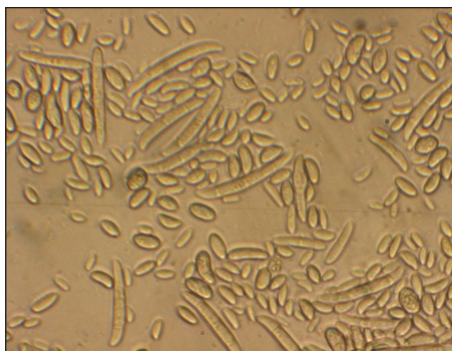
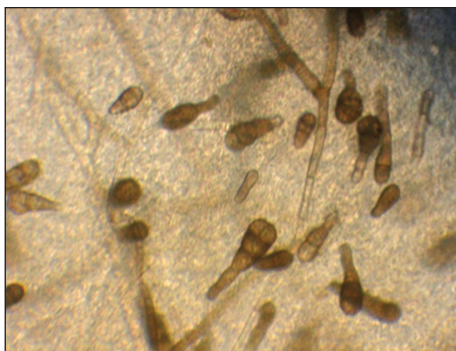
B) *Aspergillus parasiticus* (egysoros fej), C) *Aspergillus niger* (kétsoros fej)
[https://www.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop425/2011_0001_521_](https://www.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop425/2011_0001_521_Elelmiszer-mikrobiologia/ch03s03.html)
[Elelmiszer-mikrobiologia/ch03s03.html](https://www.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop425/2011_0001_521_Elelmiszer-mikrobiologia/ch03s03.html))



21. ábra. *Aspergillus niger* mikroszkópi képe



22. ábra. *Penicillium* nemzetségbe tartozó penészgomba mikroszkópi képe



23. ábra. Az *Alternaria* és a *Fusarium* nemzetségbe tartozó penészgombák jellegzetes konídiumainak mikroszkópi képe

8. ÉLELMISZER-EREDETŰ MEGBETEGEDÉST OKOZÓ BAKTÉRIUMOK IZOLÁLÁSA SZELEKTÍV TÁPTALAJOKON

A laborgyakorlat célja:

Az élelmiszer-biztonsági szempontból jelentős baktériumok izolálására alkalmas szelektív táptalajok megismerése és alkalmazása a laboratóriumi gyakorlatban különféle élelmiszerminták mikrobiológiai vizsgálata során.

Elméleti háttér:

A táptalajok a mikroorganizmusok tenyésztésére szolgáló, meghatározott összetételű, szilárd vagy folyékony közegek, amelyek a mikroszervezetek életműködéséhez szükséges tápanyagokat felvehető formában tartalmazzák. Összetételük szerint lehetnek természetes eredetűek vagy szintetikusak. A természetes eredetű táptalajok valamilyen természetes anyagot vagy kivonatot tartalmaznak (pl. burgonya, élesztő, pepton), amelynek összetevői pontosan nem ismertek. A szintetikus táptalajok kémiai összetevői pontosan meghatározottak.

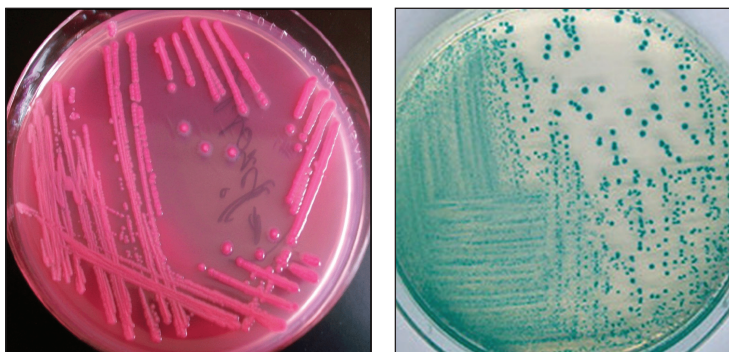
Alkalmazás szerint a tápközeg szolgálhat általános, szelektív vagy differenciáló tenyésztésre, és szolgálhat valamely mikroba dúsítására is. Az alaptáptalaj sokféle mikroorganizmus tenyésztésére alkalmas, a mikrobák szaporodásához szükséges alapanyagokon kívül speciális anyagokat nem tartalmaz. A szelektív táptalajok olyan tápközegek, amelyek egy vagy csak néhány mikrobafaj szaporodását úgy biztosítják, hogy más mikroorganizmusok szaporodását lassítják vagy megakadályozzák. A gátlást elérhetjük gátlóanyagok, antibiotikumok adagolásával vagy alacsony pH-értékek kiválasztásával. A differenciáló táptalajok a mikroorganizmusok egyes anyagcseretermékeinek kimutatására alkalmas adalékanyagot tartalmazó tápközegek.

A MacConkey agar neutrál vöröset, kristályibolyát és epesókat tartalmaz. Gátolja a Gram-pozitív baktériumokat (a kristályibolyának köszönhetően), és serkenti a Gram-negatív baktériumok fejlődését. Az *Escherichia coli* baktérium rózsaszínű/piros telepeket képez a táptalaj felületén (24. ábra).

A TBX Chromo agar olyan szelektív táptalaj, amely az *E. coli* élelmiszer-mintákból való izolálására alkalmas. Összetételében megtalálható kazein-pepton, epesók, X-β-D-glükuronid. A táptalajon kifejlődő *E. coli* telepek türkizkék színűek (24. ábra).

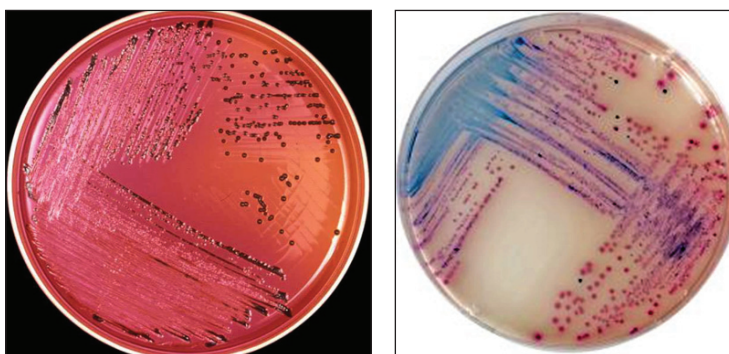
Az XLD táptalaj a *Salmonella* és a *Shigella* baktériumok kimutatására egyaránt alkalmas élelmiszer- és klinikai mintákból. A táptalajon kifejlődött *Salmonella*-telepek piros színűek, esetenként a telep közepe megfeketedik, mivel a tioszulfátok metabolizálása során kén-hidrogén képződik (25. ábra).

A CHROMagarTMSalmonella szelektív táptalaj segítségével elkülöníthetők az élelmiszermintákból származó jellegzetesen lilára színeződő *Salmonella* baktériumtelepek. Összetételében a táptalaj peptont, élesztőkivonatot, kromogén és szelektív szubsztrátot tartalmaz (25. ábra).



24. ábra. *Escherichia coli* baktériumtelepek MacConkey és TBX Chromo agar szelektív táptalajokon

(https://www.researchgate.net/figure/E-coli-colony-morphology-on-MacConkey-agar-plate-Presumptive-identification-of-E-coli_fig2_319130632, <https://www.fiers.be/fr/produits/life-science/microbiologie/chromogenic-agars/tbx-chromo-agar-1>)

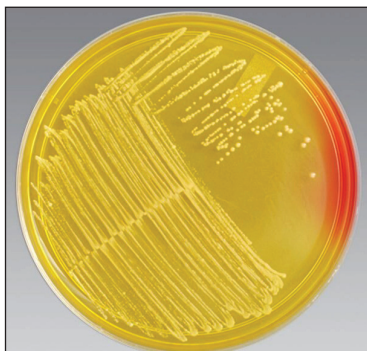


25. ábra. *Salmonella* baktériumtelepek XLD és CHROMagarTMSalmonella táptalajokon

(https://www.researchgate.net/figure/Salmonella-spp-on-XLD-Agar_fig2_274080438, <http://www.chromagar.com/clinical-microbiology-chromagar-salmonella-focus-on-salmonella-species-27.html#.XfVGqWQzbIU>)

A Mannitol Salt Agar szelektív táptalaj a *Staphylococcus aureus* baktérium kimutatására és izolálására alkalmas. Összetevői között kiemelt jelentősége van a 7,5% NaCl-tartalmának, amely egy szelektív tényezőt képvisel, ugyanis a *Staphylococcus* baktériumokon kívül a többinek a fejlődését általában gátolja. Tartalmaz még mannitolt és fenolvörös indikátort. A *S. aureus* képes fermentálni a mannitolt, a pH-változás következtében a táptalaj színe sárgára változik a kis sárga színű baktériumtelepek körül (26. ábra).

A *Bacillus cereus* baktérium kimutatására használható szelektív tápközeg például a ChromoBio® Cereus Base táptalaj. A táptalajon kifejlődő *B. cereus* telepek kék színűek fehér opálos széllel, a *B. subtilis* telepek szintén kék színűek, viszont fehér opálos szél nélkül.



26. ábra. *Staphylococcus aureus* telepek Mannitol Salt Agar táptalajon

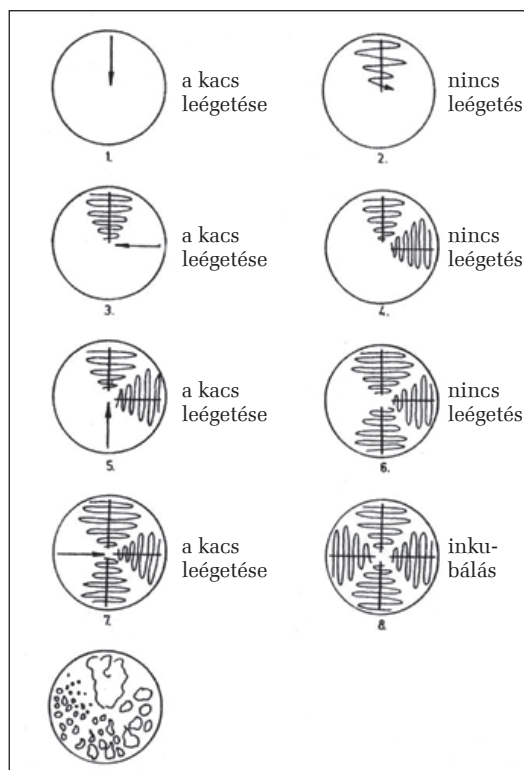
(<https://www.fishersci.com/shop/products/mannitol-salt-agar-15-pk/r01581>)

A gyakorlat menete és értékelése:

Első lépésben elkészítjük a kiválasztott vizsgált baktériumok (*Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*) izolálására alkalmas szelektív táptalajokat és steril Petri-csészékbe töltjük. A táptalajok megszilárdulása után oltókacs segítségével a baktériumtenyészetekből szélesztéssel leoltunk a megfelelő szelektív táptalaj felületére a szintenyészet készítés módszerét alkalmazva négy szektorba (27. ábra).

Ha a szélesztést megfelelően végeztük, akkor az utolsó szektorban külön álló telepek fejlődnek ki, és ezáltal megfigyelhetők a jellegzetes telepmorfológiai tulajdonságok az adott szelektív táptalajon.

A 37 °C-on 48 óráig tartó inkubálást követően megfigyeljük a vizsgált baktérium esetében a kifejlődött telep alakját, színét, esetenként a táptalaj színének a változását (pl. a szénhidrátok fermentációja során).



27. ábra. Színtenyészet létrehozása négy mezőben történő szélesztéssel
(Lukacsovics, 2002)

9. A SZAPORODÁS HŐMÉRSÉKLET-IGÉNYÉNEK A MEGHATÁROZÁSA

A laborgyakorlat célja:

A baktériumok szaporodásának vizsgálata eltérő hőmérsékleti értékek mellett, valamint az alacsony és a magas hőmérséklet bakteriosztatikus hatásának követése.

Elméleti háttér:

A mikroorganizmusok szaporodását és élettevékenységét meghatározó legfontosabb környezeti tényező a hőmérséklet. A hőmérséklet változása befolyásolja a szaporodási sebességet, a végső sejtszámot, a sejt kémiai összetételét stb. A maximális hőmérséklet felett a mikroorganizmusok elpusztulnak, míg a minimális hőmérséklet alatt túlélhetnek ugyan, de szaporodásuk megáll.

A hőmérséklet-minimum az a hőmérséklet, amely alatt a mikroorganizmus nem képes szaporodni (életjelenségek, bizonyos mértékű anyagcsere azonban még lehetséges). A hőmérséklet-optimum az a hőmérséklet, ahol maximális sebességű a szaporodás (az egyes anyagcserelépések, termékképzés stb. optima azonban nem feltétlenül esik egybe a szaporodás optimális hőmérsékletével). A hőmérséklet-maximum az a hőmérséklet, amely felett már szaporodást nem tapasztalunk (az anyagcsere azonban még nem feltétlenül áll le).

A legtöbb mikroba a mezofilek közé tartozik (optimális hőmérséklet: 30–40 °C), köztük találjuk az élelmiszerekben előforduló kórokozókat is. A konzerviparban különös jelentőségűek a nagy hőmérsékleti optimumú termofil baktériumok. A termofilek legfontosabb képviselői a *Bacillus* és a *Clostridium* fajok. A közepes hőmérsékleten és a víz fagypontja közelében is jól szaporodó pszichrotrof mikrobák közé számos romlást okozó baktérium (*Enterobacter*, *Serratia*, *Vibrio*, *Aeromonas*), élesztő- és penészgomba tartozik (például a *Candida*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Penicillium* nemzetségekhez tartozó egyes fajok). A valódi hidegkedvelő, pszichrofil mikroorganizmusok maximális szaporodási hőmérséklete nem haladja meg a 20 °C-ot. A pszichrofil baktériumok nagy része Gram-negatív, aerob faj. Élelmiszerekben gyakoriak a *Pseudomonas* és rokon nemzetségek képviselői, az *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Flavobacter* fajok. A talajból nagy számban kerülhetnek élelmiszerekre pszichrofil Gram-pozitív baktériumok is (*Arthrobacter*, korineformok, spóráképzők). A kórokozó baktériumok többsége nem szaporodik 5 °C-nál kisebb hőmérsékleten, kivétel a *Listeria monocytogenes*, a *Yersinia enterocolitica* és a *Clostridium botulinum* E típusa. Ha egy mikroba képes szaporodásnak indulni alacsony hőmérsékleten, a lappangási idő több napra is megnyúlik, a generációs idő is órákkal meghosszabbodik.

A szaporodás minimális és maximális hőmérsékleti határait azonban csak közelítőleg lehet megadni, mert azok nemcsak fajonként, hanem azonos törzsnél is változnak az egyéb környezeti tényezők (pl. pH) hatására.

A gyakorlat menete:

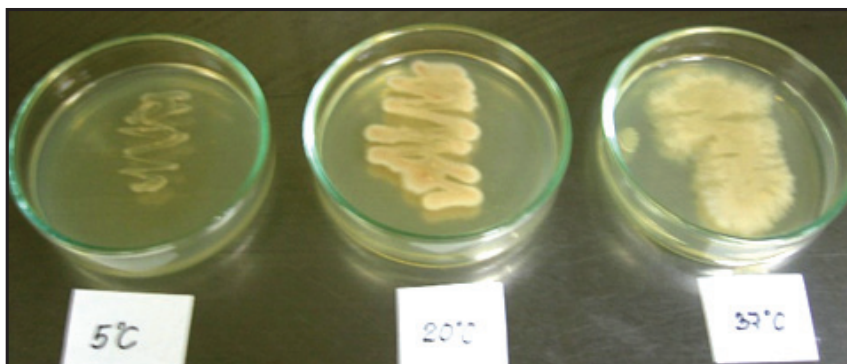
A vizsgált mikroorganizmust vonáskultúra formájában oltjuk a Petri-csészékben lévő szilárd táptalaj felületére. Ha egy Petri-csészébe a táptalaj felületére egymás mellé, különböző szektorokba, többféle mikrobát oltunk, ügyelni kell arra, hogy egymással ne érintkezzenek, és a Petri-csészék alján megfelelően legyen tüntetve a nevük.

A baktériumok esetében Nutrient táptalajt, a mikroszkopikus gombák esetében komplex táptalajt (pepton 10 g, glükóz 40 g, élesztőkivonat 10 g, agar 20 g, desztillált víz 1000 ml) használunk. A Petri-csészék tetejére felírjuk a tenyésztési hőmérsékletet (5, 20, 37, 55 °C), és 48 óráig (a mikroszkopikus gombák esetében 5 napig) a megfelelő hőmérsékleten inkubáljuk.

A vizsgálathoz elsősorban az élelmiszerek szempontjából jelentős mikroorganizmusokat választunk ki, például *Pseudomonas* fajokat, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp.

Eredmények és értékelés:

Az inkubálási idő elteltével a termosztátból kivesszük a tenyészeteket, és megfigyeljük a szaporodás mértékét a hőmérséklet függvényében (28. ábra). Az eredményeket a 2. táblázatban foglaljuk össze. A szaporodást + jellel, az igen jó szaporodást +++ jellel, a szaporodás hiányát – jellel rögzítjük a táblázatban.



28. ábra. Szaporodás eltérő hőmérsékleteken

2. táblázat. Mikroorganizmusok szaporodása a hőmérséklet függvényében

Vizsgált mikroorganizmus	5 °C	20 °C	37 °C	55 °C
<i>Pseudomonas fluorescens</i>				
<i>Escherichia coli</i>				
<i>Bacillus cereus</i>				
<i>Staphylococcus aureus</i>				
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>				
<i>Aspergillus niger</i>				
<i>Penicillium sp.</i>				

10. FAGYASZTOTT ÉLELMISZEREK MIKROBIOLÓGIAI VIZSGÁLATA

A laborgyakorlat célja:

A fagyasztást túlélő baktériumok kimutatása, amelyek a gyorsfagyasztott termékek helytelen tárolása, a hűtőlánc megszakadása esetén a termék romlását okozhatják, vagy mint kórokozók lehetnek jelen.

Elméleti háttér:

A gyorsfagyasztott termékek megfelelően fagyott állapotban mikrobiológiai romlás nélkül gyakorlatilag korlátlan ideig eltarthatók. Ennek feltétele a folyamatos és megszakítás nélküli hűtőlánc. A fagyasztás, majd az azt követő mélyhűtés alatt a mikroorganizmusok csak részben pusztulnak el. A fagyott élelmiszerben csak azok a mikrobák tudnak szaporodni, amelyek minimális hőmérséklete elég kicsi, és amelyek egyidejűleg elviselik a kis vízaktivitást is, pszichrofilek és xerotoleránsok egyszerre. Ezek a mikroorganizmusok (például a *Pseudomonas fluorescens*, *Acinetobacter anitratus*, *Bacillus insolitus*) képesek szaporodni $-5-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on is, ha az élelmiszerben még folyékony állapotú víz marad. A szaporodás azonban lassú, a generációs idő 2-10 nap.

A mikroorganizmusok fagyasztással szembeni ellenálló képessége különböző. Egyesek gyorsan elpusztulnak, mások a fagyasztási folyamat alatt sejtkárosodást szenvednek, és később a fagyott tárolás alatt pusztulnak el, megint mások viszont a fagyasztást károsodás nélkül túlélnek (baktériumspórák, Gram-pozitív kokkuszek). A Gram-negatív baktériumok érzékenyebbek a fagyasztásra.

A pusztulás kiváltó oka a jégkristályok képződése és a vízaktivitás csökkenése. Lassú felengedtetés alatt lehetőség nyílik a mikrobaszaporodás megindulására. A mikrobák különböző érzékenysége miatt a mikrobiota összetétele a fagyasztás után jelentősen különbözhet a fagyasztás előttihez képest. Általában jellemző a Gram-pozitív baktériumok feldúsulása. A pusztulás mértékét az élelmiszerek összetevői mint védőanyagok csökkenthetik.

A felengedtetett termékben mindig találhatók mikroorganizmusok, amelyek romlást okoznak, valamint számolni kell a kórokozók túlélésével is. A termék típusától, a nyersanyag minőségétől, a technológiától, a higiéniai viszonyoktól függően a gyorsfagyasztott élelmiszereken változatos összetételű és általában jelentős nagyságú (10^3-10^5 TKE/g) mikrobiota marad, amely a felengedtetést követően a termék gyors romlását okozza.

A fagyasztva tárolt élelmiszerek érzékszervi, táplálkozási és mikrobiológiai tulajdonságait több tényező befolyásolja, ezek a következők: a nyersanyagok

minősége, a nyersanyagok feldolgozása a fagyasztás előtt, a fagyasztás sebessége és módja, a tárolási paraméterek (a hőmérséklet és a relatív nedvességtartalom), a fagyasztva tárolás időtartama, a csomagolás minősége.

A fagyasztott zöldségfélék esetében a fagyasztás előtt rendszerint előfőzést alkalmaznak, a blansírozás 90-100 °C-on, néhány percre tart, ami 2-3 nagyságrenddel csökkentheti a mikrobás szennyezettséget. Az előfőzés után a lehető legrövidebb idő alatt le kell hűteni és fagyasztani a terméket. Fagyasztott zöldségekről gyakran izolálhatók *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus* fajok, mikrokokuszok és tejsavbaktériumok. A patogén baktériumok (*Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*) jelenléte súlyos higiéniai hiányosságokra vagy az előfőzés elégtelenségére utal.

A gyümölcsöket általában nyersen fagyasztják, mert az előfőzés megváltoztatná az állagát. Kivételt képeznek a sütőipari termékekhez használt fagyasztott gyümölcsök. A gyorsfagyasztott gyümölcsök általában penészgombaspórákat, élesztőgombákat és tejsavbaktériumokat tartalmaznak.

A megfelelően fagyasztott hús mikrobásan nem romlik meg. A mikroorganizmusok fokozatosan kihalnak a fagyasztási hőmérsékleten, de enzimeik (lipázok, lipoxidázok) rezisztensek és aktívak maradnak -30 °C-ig. -5 és -10 °C közötti tárolási hőmérsékleten bizonyos élesztőgombák (*Leucosporidium scottii*) és penészgombák (*Cladosporium herbarum*) képesek szaporodni, kis foltokat alkotnak a húsok felületén.

A gyakorlat menete:

A gyakorlat során különféle gyorsfagyasztott élelmiszereket (fagyasztott zöldségek és gyümölcsök, fagyasztott húskészítmények, fagyasztott sütemény-alapanyagok) vizsgálunk, és meghatározzuk az élősejtszámot lemezöntéssel.

A gyorsfagyasztott élelmiszerből felengedtetés után 10 g mintát mérünk egy 90 ml steril hígítófolyadékot tartalmazó lombikba, amelyben többször felrázva és összekeverve 20 percre tartjuk. Ezt követően hígítási sort készítünk (10^{-5} hígításig). A megfelelő hígításokból két párhuzamban 1-1 ml mennyiségeket mérünk Petri-csészékbe. Ezt követően 15-15 ml 45 °C-ra visszahűtött Nutrient táptalajt töltünk a Petri-csészékbe, majd alaposan elkeverjük. Megszilárdulás után felfordított állapotban 48 óráig inkubáljuk 37 °C-on.

A mikrobiológiai vizsgálatok során elvégezzük a *Listeria monocytogenes* baktérium kimutatását is, mivel ez a baktérium általában kimutatható fagyasztott zöldségfélékből. Az alapszuspenzióból, valamint a 10^{-1} , 10^{-2} és 10^{-3} -as hígításokból leoltunk két párhuzamban 0,1-0,1 ml-t szélesztéssel *Listeria monocytogenes* kimutatására alkalmas szelektív táptalajra (például *Listeria mono* Differential Agar táptalaj). Ezt követi az inkubálás 37 °C-on 48 óráig.

Eredmények és értékelés:

Az azonos hígításhoz tartozó, 30-300 közötti számban telepet tartalmazó Petri-csészékben megszámoljuk a telepek számát, átlagoljuk, és a hígítási fok figyelembevételével megadjuk a vizsgált gyorsfagyasztott élelmiszer mikrobaszámát (TKE/g).

A szelektív táptalaj felületén kifejlődött, a *Listeria monocytogenes* baktériumra jellemző alakú és színű telepeket is megszámoljuk, és a szélesztéses tenyésztési eljárásnak megfelelően meghatározzuk a baktériumok számát (TKE/g).

11. OZMÓZIS-HATÁSOK VIZSGÁLATA MIKROORGANIZMUSOKON

A laborgyakorlat célja:

A cukrozással és sózással megvalósítható vízelvonásos tartósítás antimikrobiális hatásának vizsgálata különféle élelmiszeripari szempontból jelentős mikroorganizmusok esetében.

Elméleti háttér:

Ha a mikroorganizmus sejtmembránjának két oldalán az oldatok töménysége különbözik, akkor a membránra ható nyomás is különböző lehet. Az ozmózisnyomás nagysága függ az oldott anyag koncentrációjától és kémiai minőségétől. A koncentrációtól függően a kémiai anyagok hatása lehet pozitív (serkenti a baktériumok növekedését) vagy negatív (baktericid) hatás, illetve közömbös. Például a glükóz 0,5-2%-ban értékes tápanyag a heterotróf baktériumok számára, magas koncentráció (20-40%) esetén plazmolizáló hatást vált ki.

A különböző oldatok, tápközegek ozmózisnyomása hatást gyakorolhat a mikroorganizmusok élettevékenységére. A cukroknál a kisebb molekulásúlyúak a gátlóbbak, a sók a növekedő vegyértékkel és molekulasúlyllyal a toxikusabbak. A mikroorganizmusok nagy része a sótartalmat lényegesen kisebb koncentrációban viseli el, mint az oldott szerves vegyületeket (pl. cukrokat). Amíg cukorból a 60-65 súlyszázalékos oldatban is történhet szaporodás, addig oldott sókból maximálisan 20%-osban, és az elviselés határa 26% (a *Halobacterium* esetében). Halofil baktériumok például a *Micrococcus varians*, a *Staphylococcus carnosus*, a *Paracoccus denitrificans*, a *Serratia marcescens*. Egyes ozmofil élesztőgombák 80%-os cukorkoncentrációt is képesek elviselni. A *Zygosaccharomyces lentus* 60% cukortartalom mellett is képes szaporodni és romlást okozni.

A vízelvonásos tartósítás megvalósítható a szabad víztartalom lekötésével, cukrozással, sózással is. Főként cukrozással készíthetők tartós, közvetlenül fogyasztható termékek (például dzsemek, szörpök, gyümölcszselék, lekvárok). Az ilyen termékek mikrobiológiai biztonságát további tényezők – például alacsony pH, aszeptikus csomagolás – segítik elő. Sózással halak, húsok, zöldségek tartósíthatók. A nagy sótartalom miatt ezek közvetlenül nem, csak kiáztatás után fogyaszthatók.

A só konzerváló hatásának megnyilvánulásai a következők:

– a sejtnedvek ozmotikus nyomásának növelése következtében a romlást okozó mikrobák elveszítik vitalitásukat;

– a termék dehidratálása, a mikrobák aktivitásához rendelkezésre álló víz mennyiségének csökkentése;

– az oxigén oldékonyságának csökkentése a páclében (az aerob romlást okozó mikrobák gátlása).

A munka menete:

A vizsgált mikroorganizmus-tenyészetekből sejtuszpenziót készítünk. Miután steril kémcsövekbe kipipettáztuk a megfelelő konyhasó-, illetve cukortartalmú tápoldatokat (10 ml/kémcső), a különböző koncentrációjú tápoldatokba 0,1 ml mikroorganizmus-szuszenziót oltunk le.

Vizsgált mikroorganizmusok: *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Serratia marcescens*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger*.

Eredmények és értékelés:

A 3. táblázat felhasználásával értékeljük a vizsgált mikroorganizmusok szaporodását, illetve annak elmaradását. A penészgombák a felületen képeznek telepet. A szaporodás egyéb formái: zavarosodás, üledékképződés stb.

3. táblázat. Mikroorganizmusok tenyésztése különböző NaCl- és szacharóztartalmú táplevesekben

Vizsgált mikroba	Konyhasótartalom, %					Cukortartalom, %				
	2	4	6	10	20	5	10	20	30	40
<i>Escherichia coli</i>										
<i>Micrococcus luteus</i>										
<i>Staphylococcus aureus</i>										
<i>Serratia marcescens</i>										
<i>Bacillus cereus</i>										
<i>Pseudomonas fluorescens</i>										
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>										
<i>Aspergillus niger</i>										

Jelölések: – nincs szaporodás, + gyenge szaporodás, ++ közepes szaporodás, +++ erős szaporodás.

12. ANTIBIOTIKUMOK HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA ANTIBIOTIKUMKORONGOK SEGÍTSÉGÉVEL

A laborgyakorlat célja:

A különféle antibiotikumok antimikrobás hatásának vizsgálata különböző baktériumok esetében.

Elméleti háttér:

Alexander Fleming 1928-ban megfigyelte, hogy a *Staphylococcus aureus* baktérium szaporodása gátolt a *Penicillium notatum* penészgombatelepek környékén. Bebizonyította, hogy a gombatenyészet fermentlevének hatóanyaga, a penicillin okozza a baktériumok pusztulását. Az antibiotikumok baktériumok, illetve gombák anyagcseréje során termelődött olyan vegyületek, amelyek kis koncentrációban hatásos és specifikus anyagcseregátló szerek, amelyek ezáltal más mikrobákat elpusztítanak vagy szaporodásukat korlátozzák. A legismertebb antibiotikumtermelő baktériumok a *Streptomyces* és a *Bacillus* nemzetségbe, a gombák közül pedig a *Penicillium* nemzetségbe tartoznak.

Az antibakteriális hatás spektruma szerint szűk és széles spektrumú antibiotikumok léteznek. A szűk spektrumú antibiotikumok a baktériumoknak csak bizonyos csoportjára (pl. csak a Gram-pozitívokra) hatnak. Főleg akkor alkalmazzák, ha nagy valószínűséggel lehet tudni, hogy melyik baktériumtörzs okozta az adott fertőzést. A széles spektrumú antibiotikumok számos, egymástól rendszertanilag távol álló baktériumfajra is hatásosak.

A baktériumokra gyakorolt hatás szerint *bakteriosztatikus* és *baktericid* antibiotikumokat különböztetünk meg. A bakteriosztatikus antibiotikumok (például a kloramfenikol, az eritromicin) csak gátolják a baktériumok szaporodását, de nem pusztítják el azokat. A minimális gátló koncentráció (MIC) az a legkisebb antibiotikum koncentráció mg/l-ben kifejezve, ami a baktériumok szaporodását gátolja. A baktericid hatású antibiotikumok (például a vankomicin, a rifampin) adott koncentrációban a baktériumpopuláció pusztulását okozzák. A minimális baktericid koncentráció (MBC) az a legkisebb antibiotikum koncentráció mg/l-ben kifejezve, ami a baktériumokat elpusztítja. Az antibiotikumok azáltal fejtik ki hatásukat, hogy károsítják a baktériumok életfontosságú struktúráit vagy funkcióit, például a sejtfalszintézist, a sejtmembránt, a DNS-, az RNS- és a fehérjeszintézist.

A rezisztens fajok és törzsek egyre nehezebbé teszik egyes régebben jól kezelhető betegségek gyógyítását. A rezisztencia kialakulásának okai lehetnek: a baktericidális enzimek lebontják az antibiotikumot, mutáció útján megváltozik a sejt azon célmolekulája, ahol az antibiotikum kifejti hatását, a baktérium sejtfal-permea-

bilitásának megváltozása. Az átviteli rezisztencia a legjelentősebb rezisztencia-mechanizmus, ami megvalósulhat konjugáció, transzdukció vagy transzformáció által. Az R-plazmid átadása Gram-negatív baktériumfajokon belül a törzsek között általános, de bekövetkezhet fajok között is. Így kerülhet át polirezisztens plazmid *Salmonella* fajokból *Escherichia coli* törzsekre.

Az antibiotikumokat mindig megfelelő dózisban és ideig szabad alkalmazni. Kerülni kell az antibiotikumok felesleges kombinációját, a szükségtelenül hosszú kezelést.

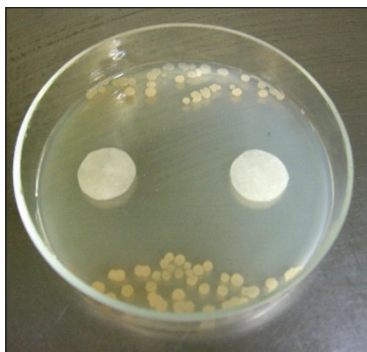
A gyakorlat menete:

A vizsgálat során a korongdiffúziós módszert alkalmazzuk. Nutrient vagy Müller-Hinton táptalajt tartalmazó Petri-csészékbe szélesztéssel leoltjuk a teszt-mikrobákat az előzőleg elkészített megfelelő sűrűségű szuszpenzióból, majd a beoltott lemezekre steril csipesz segítségével kereskedelembe kapható antibiotikum tartalmú korongokat (Streptomycin 10 µg, Ofloxacin 5 µg, Amikacin 30 mg, Ampicillin 10 µg, Erythromycin 15 µg, Gentamicin 10 µg, Vancomycin 30 µg, Rifampicin 5 µg, Tobramycin 10 µg, Cefoxitin 30 µg) helyezünk és 15 percig szobahőmérsékleten tartjuk. Ezt követi az inkubálás 24-48 óráig, a vizsgált baktérium számára optimális szaporodási hőmérsékleten.

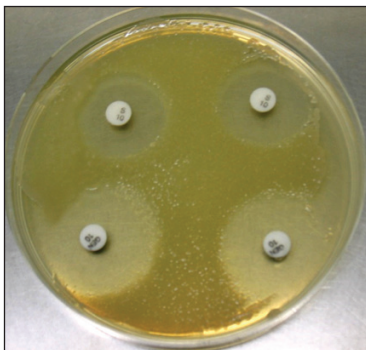
A korongra felvitt anyag a táptalajba diffundál, és a diffúzió gyorsaságától, a hatóanyag mennyiségétől és a mikroba érzékenységtől függően kisebb-nagyobb gátlási zónát hoz létre.

Eredmények és értékelés:

Lemérjük a gátlási zónák átmérőjét (mm) az egyes antibiotikumok és vizsgált baktériumok esetében (29., illetve 30. ábra). Következtetéseket fogalmazunk meg az egyes antibiotikumok hatásának mértékéről és a mikrobák érzékenységevel, rezisztenciájával kapcsolatban.



29. ábra. Az ampicillin antibakteriális hatása következtében kialakult gátlási zónák a *Bacillus subtilis* esetében



30. ábra. *A sztreptomycin és a gentamicin antibiotikumok hatása az Escherichia coli baktériumra*

13. NÖVÉNYI ANTIMIKROBIÁLIS ANYAGOK HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA

A laborgyakorlat célja:

Növényi eredetű anyagok, kivonatok antimikrobiális hatásának vizsgálata és annak kimutatása, hogy az alkalmazott koncentráció és a gátlás mértékének függvényében ezek a növényi anyagok felhasználhatók vagy nem mint természetes tartósítószer.

Elméleti háttér:

A fűszerek illat- és ízanyagokat tartalmazó növényi részek (magvak, termések, virágok, levelek, gyökér, héj), amelyek kis mennyiségben is növelik az élelmiszer élvezeti értékét. Számos fűszer antimikrobiális hatású vegyületeket tartalmaz, amelyeket gyűjtőnéven fitoncidoknak nevezünk. A fitoncidok a növények biológiai védelmét szolgálják. Ezek kémiaiilag igen sokfélék, eltérő szerkezetűek, gyakran illóolajok, terpének, glikozidok stb. Mikrobiológiai szempontból lehetnek általános mikrobagátlók (pl. benzoésav a fahéjban, szegfűszegben, ánizsban, allicin a fokhagymában) vagy csak baktériumok, illetve gombák ellen hatásosak (például az eugenol bakteriosztatikus, a mustárolaj pedig élesztőgombák ellen hat). A fűszerek kifejezett íze, illata miatt azonban csak olyan kis mennyiségben adhatók az élelmiszerekhez, hogy mikrobaellenes hatásuk nem számottevő. A fűszerként felhasznált növényfajok száma több százra tehető. Népszerűségük egyrészt az élelmiszerek ízesítésének fokozására való képességükkel, másrészt azok egészségügyi előnyeivel (például az antimikrobiális hatással) kapcsolatos.

Az illóolajokat régóta használják az élelmiszeriparban, elsősorban aromaanyagokként, a fogyasztók pedig általában elfogadják a használatukat. Felhasználásuknak általában egy akadálya van: a nagyon erős aromájuk, amely az élelmiszer organoleptikus tulajdonságainak a megváltozásához vezet, ha túl nagy koncentrációban alkalmazzák. A növényi illóolajok antimikrobiális, antioxidáns és rákellenes hatása mellett fontos kiemelni napjainkban az aktív csomagolás területén való alkalmazási lehetőségüket is.

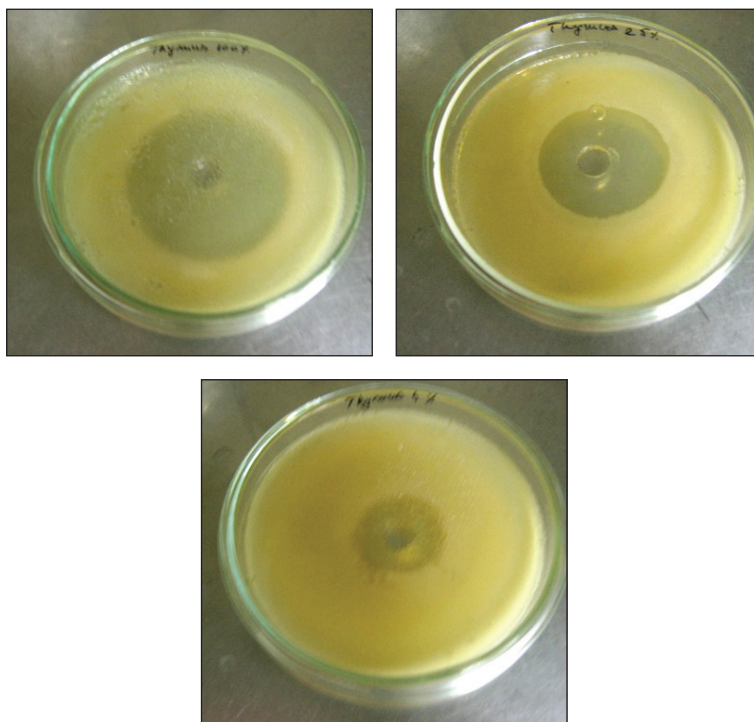
Az illóolajok baktériumellenes hatásának főbb helyszínei és mechanizmusai a következők: membrándestabilizáció és -károsítás, a membránlokalizált metabolikus folyamatok gátlása, a membránfehérjék károsítása, citoplazmatikus összetevők, anyagcseretermékek és ionok szivárgása. Azok az illóolajok (például kakukkfű-, oregánó-illóolaj), amelyek nagy százalékban tartalmaznak fenolos vegyületeket, a legerősebb antibakteriális tulajdonságokkal rendelkeznek.

A gyakorlat menete:

A gyakorlat során különféle fűszernövények (például hagyma, fokhagyma, gyömbér) és növényi illóolajok (kakukkfű, oregánó, menta, citromfű, boróka, zsálya, kömény) antimikrobiális hatását vizsgáljuk agardiffúziós módszerrel. A vizsgálatokat különféle élelmiszer-biztonsági szempontból jelentős baktérium esetében végezzük el, mint az *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas fluorescens*.

A kiválasztott baktériumszuszpenzióból 0,1 ml-t Nutrient táptalaj felületére oltunk szélesztéssel. A táptalaj közepébe steril eszközzel (például steril üvegcső vagy műanyag pipettahegy segítségével) 10 mm átmérőjű lyukat vágunk, majd ide 0,1 ml illóolajat pipettázunk vagy steril mozsárban összetört fűszernövény-törmelékkel helyezzük. Ezt követi az inkubálás 24-48 óráig 37 °C-on.

Erős antimikrobiális hatással rendelkező illóolajok esetében hígításokat végzünk és meghatározzuk a minimális gátló koncentrációt (31. ábra). A hígítófolyadék (pl. etanol) antibakteriális hatását is tesztelni kell.

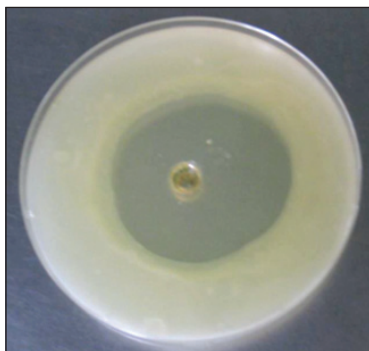


31. ábra. A kakukkfű-illóolaj hatására kialakult gátlási zónák az alkalmazott koncentrációk (100%, 25%, 4%) függvényében a *Listeria monocytogenes* baktérium esetében

Eredmények és értékelés:

Teljes gátlás esetén a táptalaj felületén nem fejlődnek ki a baktériumtelepek. Ez esetben az adott növényi anyag vagy illóolaj baktericid hatással rendelkezik.

Részleges gátlás esetén az illóolaj-tartalmú lyuk körül inhibíciós (gátlási) zóna alakul ki, ez esetben általában bakteriosztatikus hatásról beszélhetünk (32. ábra).



32. ábra. *Oregánó-illóolaj hatása a *Bacillus cereus* baktériumra*

Ellenálló baktériumok esetében nem alakul ki gátlási zóna.

A minimális gátló koncentráció meghatározása esetén is értékeljük a kapott eredményeket. Minél kisebb ez az érték, annál nagyobb a lehetősége az adott illóolaj gyakorlatban való alkalmazásának.

14. TEJ MIKROBIOLÓGIAI VIZSGÁLATA REDUKCIÓS PRÓBÁKKAL

A laborgyakorlat célja:

A tej mikrobiológiai minőségének kimutatására alkalmas gyors módszerek megismerése és a kapott eredmény helyes értelmezése.

Elméleti alapok:

A redukciós próbák révén a tejben lévő mikroorganizmusok száma közvetett úton, gyorsan meghatározható. A csíraszámra a benne lévő mikroorganizmusok biokémiai (oxidoredukciós) aktivitásából lehet következtetni. Mivel a tejben lévő mikroorganizmusok a tej minőségét alapvetően befolyásolják, a próba eredménye alapján minősítik (osztályokba sorolják) a tejet.

A redukciós aktivitás méréséhez olyan festékeket használnak, amelyek redukált és oxidált formája eltérő színű (ún. redox-indikátorok). A legelterjedtebb ilyen festékek a metilénkék és a rezazurin. Minél nagyobb a baktériumok száma, annál intenzívebb a biokémiai aktivitásuk, és az elszíntelenedés hamarabb bekövetkezik.

A metilénkék- és a rezazurinpróbák eredményét sok tényező befolyásolja, ezért a mikrobaszám és a próba eredménye között nincs szoros összefüggés. A próba azonban alkalmas a nem higiénikusan kezelt (10^6 sejt/cm³-nél nagyobb csíraszámú) nyerstej minősítésére, illetve kiválasztására. A tapasztalatok szerint a kis csíraszámú tejek vizsgálatára a metilénkék alkalmasabb, a rezazurin redukciós próba viszont gyorsabb és a gyengébben redukáló hatású baktériumokra érzékenyebb.

A tej kiváló táptalaj sok mikroorganizmus számára, ami a nagy vízáktivitásnak, a semleges pH-nak és a gazdag tápanyagtartalomnak tulajdonítható. A tej mikrobataralma és a mikrobiota összetétele nagyon fontos minőségi jellemző. A frissen fejt tej – ha kis számban is – tartalmaz mikroorganizmusokat (például *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Aerococcus*, *Staphylococcus* fajok). A tejsavbaktériumok a szarvasmarha bőrének és tőgyének normál biotájához tartoznak, így minden nyers tejben, ha kis számban is, de előfordulnak tejsavbaktériumok. A nyers tej patogén mikroorganizmusokat is tartalmazhat, mint például *Salmonella enterica*, *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*. A szennyező mikroorganizmusok tejben való előfordulásának okai: nem higiénikus fejés, használt edények, eszközök nem megfelelő tisztasága, rossz helyiség- és személyi higiénia, fertőtlenítés hiánya, rossz hűtés.

A feldolgozandó tej összetétele befolyásolja a belőle készült tejtermék minőségét. A tej összetétele, az alkotórészek aránya számos tényezőtől függ, mint

például az állat egészségétől, a tartástól, a takarmányozástól, az évszaktól. Minél tisztábban nyerik a tejet, annál könnyebben elkerülhető a termelési hiba. Bár a tejet sohasem lehet csíramentesen kifejni, a terhelés mértékét csökkenthetjük a tiszta, higiénikus körülmények megteremtésével. A friss tejet minél előbb fel kell dolgozni, hosszabb tárolás esetén azonnal hűtés alkalmazása szükséges. A feldolgozás higiéniájához a terem- és személyi higiénia, illetve a megfelelő tisztítás és fertőtlenítés is hozzátartozik.

14.1. Metilénkék redukciós próba

A legelterjedtebb redukciós próba. Metilénkék alkalmazásakor a tej szennyezettségének mértékét a tejhez adott metilénkék elszíntelenedésének gyorsaságán mérik le. A tejet az időtartam alapján minősítik. A metilénkék indikátor színe oxidált állapotban kék, redukálva színtelen. A színátváltás 0,06-0,01 V redoxpotenciál-értéknél következik be. A redukált metilénkéket a levegő oxigénje vissza-oxidálja, ezért a próbáknál a felszíni rétegeket figyelmen kívül szokták hagyni.

A gyakorlat menete:

Egy steril kémcsőbe 0,5 ml metilénkék frissen előkészített festékoldatot (5 ml telített metilénkék alkoholos oldat, amihez 195 ml desztillált vizet adagolunk) és 20 ml 37-40 °C-ra melegített tejet teszünk, majd a dugóval ellátott kémcsövet termosztátba vagy vízfürdőbe helyezzük 37 °C-ra. Megfelelő időközönként (20 perc után, 2 óra és 5 ½ óra múlva) figyeljük az elszíntelenedés mértékét (33. ábra).



33. ábra. Tejminták színe metilénkék redukciós próbával

Eredmények és értékelés:

Az elszíntelenedési idő ismeretében megadjuk a csíraszámot, és ennek alapján meghatározzuk a tej minőségét (4. táblázat).

4. táblázat. *A tej minősítése metilénkék redukciós próbával*

Az elszíntelenedési időtartam	A tej minősége	Osztály	A valószínű csíraszám 1 ml tejben
5 1/2 óránál több	Jó	I.	500 000 alatt
5 1/2 óra és 2 óra között	Megfelelő	II.	500 000–4 000 000
2 óra és 20 perc között	Gyenge	III.	4 000 000–20 millió
20 percnél kevesebb	Nagyon gyenge	IV.	20 milliónál nagyobb

14.2. Rezazurinos próba

A rezazurin ($C_{12}H_6NNaO_4$) indikátor pasztellkék színű oxidált formája 0,2 V és 0 V redoxpotenciálnál két lépésben redukálódik. Színe a redukció fokától függően előbb lila, majd rózsaszínű, később teljesen színtelenné válik.

A gyakorlat menete:

Egy steril kémcsőbe 1 ml 0,05%-os rezazurin festékoldatot és 10 ml tejet teszünk, dugóval ellátjuk, homogenizáljuk és 1 óráig 37 °C-ra termosztátba helyezzük. Az inkubálás után a próbát újból homogenizáljuk, és a szín alapján meghatározzuk a tej minőségét (5. táblázat, 34. ábra).

5. táblázat. *A tej minősítése rezazurinos próbával*

Színváltozat	A tej minősége	Osztály
Kék	Jó	I.
Lila	Megfelelő	II.
Rózsaszín	Gyenge	III.
Fehér	Nagyon gyenge	IV.



34. ábra. Tejminták vizsgálata rezazurinos próbával

15. TEJSAVBAKTÉRIUMOK SZÁMÁNAK MEGHATÁROZÁSA BREED-MÓDSZERREL

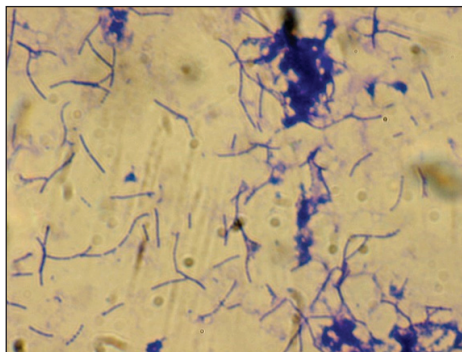
A laborgyakorlat célja:

Sejtszám-meghatározás mikroszkópi preparátum segítségével, valamint a vizsgált joghurtminta minőségének meghatározása a kapott tejsavbaktériumok csíraszámának és az egyes fajok közti arálynak megfelelően.

Elméleti alapok:

A sejtszám festett készítménnyel történő meghatározására alkalmazott legelterjedtebb módszer a Breed-féle eljárás, amelyet eredetileg nyers tej gyors vizsgálatához fejlesztettek ki, de bármely más folyékony anyag esetében is használható, ha a milliliterenkénti sejtszám 5×10^5 -nél nagyobb. A számlálókamrás eljárások többségével szemben a módszer baktériumok számlálására is alkalmas.

A tejtermékek előállításánál, mivel a tej kiváló táptalaj a baktériumok számára, pasztörözött tejet használnak, melyet tejsavbaktériumok színtenyészteteivel oltanak be. A joghurt gyártása során a tejet *Streptococcus thermophilus* és *Lactobacillus bulgaricus* tenyészetek 1:1 arányú elegyével oltják be, melyek közül a *Streptococcus* a savtermelésért, a *Lactobacillus* pedig a zamatanyagok termeléséért felelős. A fermentáció végén a friss joghurt 1 grammja kb. 10^9 baktériumsejtet tartalmaz. A joghurtban a tej laktóztartalmának egy része tejsavvá alakul, fehérjetartalma pedig az alacsony pH-n kicsapódik, ami a tápértékét nem csökkenti, ugyanakkor az emészthetőségét javítja. A *Streptococcus thermophilus* kókuszosokból álló láncot alkot, míg a *Lactobacillus bulgaricus* pálcika alakú sejtekből álló láncokat képez (35. ábra).



35. ábra. A joghurtból készült preparátumon megfigyelhető tejsavbaktériumok

A gyakorlat menete:

– A kereskedelembe vásárolt joghurtot óvatosan kinyitjuk, majd steril üveg-
bottal alaposan összekeverjük. Steril pipettával 0,5 ml-t felszívunk, kívülről tiszta
szűrőpapírral letöröljük, és ezután bevisszük a 0,5 ml-nyi mennyiséget 9,5 ml
hígítófolyadékba, vigyázva, hogy minden csepp folyadékba kerüljön. Ha az anyag
túl viszkózus, enyhén kifűjük a pipettából. A hígított anyagot ezután nagyon
alaposan homogenizáljuk.

– A zsírtalanított tárgylemezre sablon segítségével 1 cm élhosszúságú négy-
zeteket rajzolunk.

– A homogenizált mintából mikropipettával vagy kalibrált kacccsal 0,01 ml-
nyi anyagot cseppentünk a tárgylemezre, és az 1 cm²-nyi felületen elszélesztjük
oltókacs segítségével (általában egy tárgylemezen 3 négyzetre szélesztünk mintát).

– A szélesztett mintát levegőn megszáritjuk, majd lángnál rögzítjük.

– A kenetre alkoholt cseppentünk (alkoholos mosás) zsírtalanítás céljából és
hagyjuk lefolyni.

– Festés 1%-os metilénkék festékkoldattal 1,5-2 percig.

– Öblítés desztillált vízzel.

– Mikroszkópos vizsgálat: immerziós objektív alatt megszámloljuk a pálcika
alakú baktériumokat. Minden négyzetben azonos számú (kb. 5) látómezőt olvas-
sunk le, együttesen annyit, hogy az összes egyedek száma kb. 300-500 legyen, mert
a relatív hiba így csökkenthető 20% alá. A Breed-féle mikrobaszám-meghatározás
előnyét a gyors és egyszerű kivitelezhetőség jelenti. Hátránya, hogy nagy pontos-
ság nem érhető el vele, mert a kis mintamennyiség felvitele, az egyenletes réteg-
vastagság és pontos felületnagyság kialakítása sok hibalehetőséget rejt magában.

– A megfestett kenetet immerziós objektívvel vizsgálva megállapíthatjuk a
látómezőnkénti átlagos sejtszámot (x_{sejt}). Ebből a mikroszkópfaktor (f) ismeretében
kiszámíthatjuk a milliliterenkénti sejtszámot:

$$\frac{sejt}{ml} = \frac{f \cdot x_{sejt}}{T_{látómező}}$$

Ahol: $T_{látómező}$ – a látómező területe.

$$T_{látómező} = \frac{\pi \cdot d^2}{4}, d - \text{a látótér átmérője (mm);}$$

$$f - \text{a mikroszkópfaktor: } f = \frac{400}{\pi \cdot d^2 \cdot A},$$

A – az 1 cm²-nyi felületre felvitt minta (ml).

Eredmények és értékelés:

Kiszámítjuk a mikroszkópfaktort, a látómezőnkénti átlagos sejtszámot, a milliliterenkénti sejtszámot (figyelembe véve az eredeti 20×-os hígítást is). A kapott eredmények alapján következtetést vonunk le a vizsgált joghurt minőségére vonatkozóan, megadjuk a két tejsavbaktérium megközelítő arányát is.

16. FERMENTÁLT TEJTERMÉKEK MIKROBIOLÓGIAI MINŐSÉGÉNEK VIZSGÁLATA

A gyakorlat célja:

A tejtermékekben előforduló allochton mikroorganizmusok kimutatása tenyésztési mikrobiológiai eljárásokkal.

Elméleti háttér:

A fermentált tejtermékek összetétele és gyártástechnológiája rendkívül változatos. A termékek többsége tejsavbaktériumokat tartalmazó starterkultúrák beoltásával készül, és érlelésükben más mikroorganizmusok is részt vesznek.

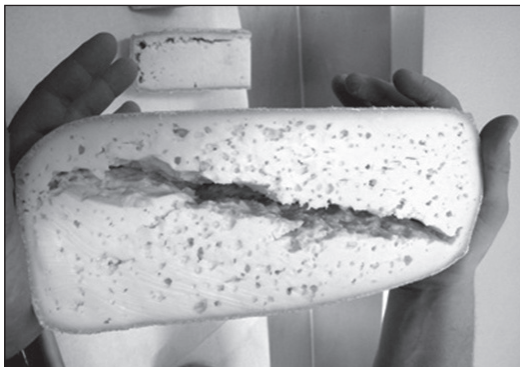
A sajtgyártás egyik fontos lépése a starterkultúra megválasztása és hozzáadása. A starterkultúra mikroorganizmusai meghatározzák a termék jellegét, állagát és aromáját. A pH-csökkenés által inhibálják, illetve elpusztítják a patogén és romlást okozó baktériumokat. Az elsődlegesen alkalmazott starterkultúrák mikrobiotájának tagjai: *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus helveticus* és *Lactobacillus delbrueckii*.

A sajtok felületén számos mikrobafaj fordulhat elő, belsejükben általában kevesebb. Mind patogén, mind romlást okozó baktériumok izolálhatók esetenként a sajtokból, amelyek különböző sajthibákat okoznak. A baktériumok mellett különféle penészgombák és élesztőgombák is megtalálhatók. Ezek a mikroorganizmusok gyakran származhatnak a sajtgyártás eszközeiről, a porból, a levegőből, illetve a higiénia hiánya is okozhatja jelenlétüket.

A romlást okozó baktériumok jelenléte meghatározható hatással van az adott sajt állagára és ízére, vagy bizonyos felületi elváltozásokat okoznak. Néhány tejsavbaktérium íz- és állományhibát okoz. Rózsaszínű elszíneződést a propionsavbaktériumok, korai puffadást a koliform baktériumok okoznak a sajtokban. A késői puffadást kiváltói a spórás baktériumok (például a *Clostridium tyrobutyricum*) (36. ábra).

Az érvényben lévő szabványok alapján a gyártási folyamat azon időpontjában, amikor a *Staphylococcus*ok száma várhatóan a legnagyobb, a megengedett intervallum 10^4 - 10^5 TKE/g, míg a *Salmonella* a forgalomba hozott termékek esetén az eltarthatósági idő alatt nem lehet jelen (2073/2005/EK; 1441/2007/EK).

A leggyakoribb ízhibák okozói a *Pseudomonas* nemzetségbe tartozó baktériumok (*P. fragi*, *P. putida*, *P. fluorescens*). A pszichrotrof baktériumok általában proteolitikus romlást váltanak ki. A tejtermékekben tapasztalható ízhibák közül a keserű vagy rothadt íz a proteolízis következménye, az avas vagy gyümölcsös íz a lipolízis eredménye. A gyümölcsös íz kialakulását például a *Pseudomonas fragi* okozza. A folyékony tejtermékek romlása leggyakrabban kellemetlen ízű



36. ábra. A sajt *Clostridium* okozta késői puffadása

(<https://cultivationofcheesemonger.wordpress.com/2016/03/07/lysozyme/>)

savanyodás, amit kis mennyiségű propionsav és ecetsav képződése vált ki. Egyes tejsavbaktériumok nyúlósodást okoznak az extracelluláris poliszacharidok képződése által, növelve ezzel a termék viszkozitását.

A fermentált tejtermékek romlását okozhatja a vad tejsavbaktériumok tevékenysége, és ennek eredménye a nem kívánatos gázképződés, mellékíz és állagváltozás.

A tejtermékekben tejsav- és laktózbontásra képes, nagy sótartalmat elviselő élesztőgombák is előfordulnak. A mikroszkopikus penészgombák közül kiemelt jelentőséggel a mikotoxintermelő fajok (például az *Aspergillus flavus*) bírnak.

A gyakorlat menete:

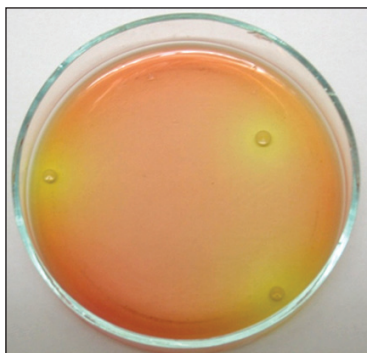
A gyakorlat során különféle sajtok és vaj mikrobiológiai vizsgálatát végezzük. A romlást okozó mikroorganizmusok közül a *Pseudomonas* baktériumok, a koliformok, az élesztőgombák és a mikroszkopikus penészgombák kimutatását végezzük szélesztéssel a megfelelő szelektív táptalajokon (*Pseudomonas* Isolation Agar Base + Glycerol supplement, ChromoBio Coliform táptalaj, Czapek Dox táptalaj). Az élelmiszer eredetű megbetegedést okozó baktériumok közül pedig a *Staphylococcus aureus*, a *Bacillus cereus*, az *Escherichia coli* és a *Clostridium perfringens* jelenlétének a kimutatását végezzük el. Alkalmazott szelektív táptalajok: Mannitol Salt Agar, ChromoBio® *Cereus* Base + *Cereus* selective supplement, TBX Chromo Agar, Clostridial Differential Broth.

A *Bacillus cereus* kimutatása esetén az alapszuszenziót hőkezeljük 80 °C-on 10 percre. A *Clostridium perfringens* kimutatása során a kémcsövekbe 10 ml szelektív táplevest, 1 ml alapszuszenziót pipetázunk és paraffint teszünk. Ezt követi a hőkezelés 80 °C-on 10 percre vízfürdőben, majd a gyors hűtés a paraffin megszilárdulása és az anaerob körülmények biztosítása céljából. Az inkubálás 44 °C-on 48 óráig tart.

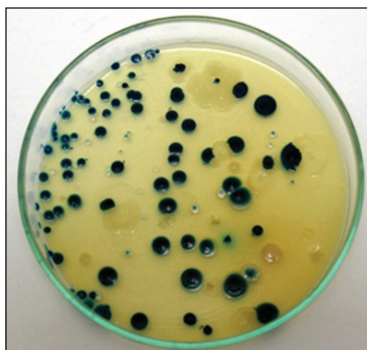
A többi vizsgált baktérium esetében az alapszuszenzióból (feltételezett magas csíraszámú minták esetében a hígításokból is) 0,1-0,1 ml-t szélesztünk a megfelelő szelektív táptalajok felületére, és ezt követően a Petri-csészéket inkubátorba helyezzük 48 óráig 37 °C-ra. Az élesztőgombák és penészgombák esetében az inkubálási hőmérséklet 30 °C, időtartama 3-5 nap.

Eredmények és értékelés:

Az inkubálást követően megfigyeljük a szelektív táptalajon adott mikrobára jellemző jellegzetes telepeket (37. ábra, 38. ábra), és meghatározzuk a telepképző egységek számát. A *Clostridium perfringens* szaporodása esetén a folyékony tenyészet feketére színeződik, és a paraffindugó megemelkedése gáztermelésre utal



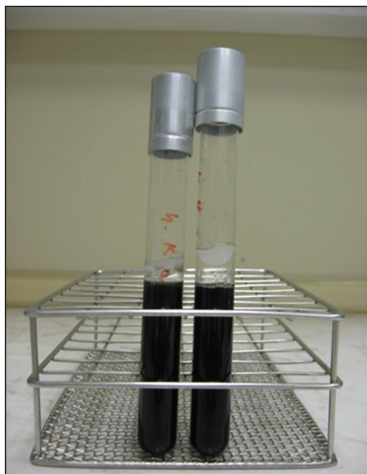
37. ábra. Sajtmintából izolált jellegzetes *Staphylococcus aureus* telepek



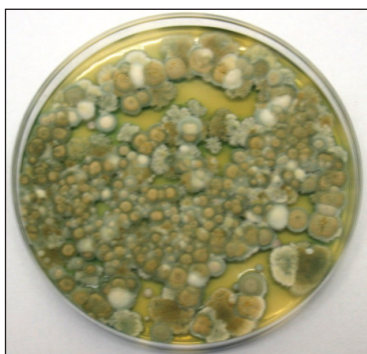
38. ábra. Sajtmintából származó *Bacillus subtilis* (kék) és *Bacillus cereus* baktériumtelepek (kék telep fehér opálos szélllel)

(39. ábra). A mikroszkopikus penészgombák (40. ábra) esetében natív mikroszkópi preparátumot is készítünk a mikotoxinogén penészgombák beazonosítása céljából.

A kapott eredmények alapján értékeljük a vizsgált fermentált tejtermékek mikrobiológiai minőségét.



39. ábra. Pozitív eredmény a *Clostridium perfringens* elszaporodása esetén



40. ábra. Sajtminából kifejlődött penészgomba telepek

17. FRISS ZÖLDSÉGEK ÉS GYÜMÖLCSÖK MIKROBIOLÓGIAI VIZSGÁLATA

A laborgyakorlat célja:

A friss zöldségek és gyümölcsök felületén előforduló mikroorganizmusok izolálása és vizsgálata, mikrobiológiai minőségük meghatározása.

Elméleti háttér:

A friss zöldségek fogyasztása napjainkban egyre népszerűbbé válik, ugyanakkor a nyersen fogyasztott zöldségekkel közvetített megbetegedések száma is növekvő tendenciát mutat. Ráadásul bizonyos esetekben a kialakult élelmiszer-fertőzésnek vagy -mérgezésnek letális következményei is vannak. Ezzel ellentétben az élelmiszerekben előforduló mikrobiológiai szennyeződések mértékére vonatkozó, hatályban lévő rendeletek csak a *Salmonella*, az *Escherichia coli* és a penészgombákra vonatkozó előírásokat és határértékeket tartalmazzák [4/1998. (XI.11) EüM Rendelet, 1441/2007/EK Rendelet].

Friss zöldségekről izolált patogén baktériumok: *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium botulinum*, *C. perfringens*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* szerotípusok, *Shigella sonnei*, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*. A zöldségek szennyeződhetnek a termesztés, a betakarítás, a szállítás és akár a további feldolgozás során.

A fogyasztásra kész friss zöldségek esetében a feldolgozás során kimutatható legjelentősebb rizikótényezőket – amelyek befolyásolják a mikrobiális biztonságot – a hőmérséklet, a víz, az eszközök és az alkalmazottak képviselik. Az olyan friss zöldségfélék, amelyek termesztése során nem alkalmaznak állati trágyát vagy az öntözéshez szennyvizet, a talajban természetes módon előforduló baktériumok kivételével nem tartalmaznak patogén baktériumokat.

A zöldségek a penészgombák (mikotoxintermelők is) kiváló táptalajai, a leginkább előfordulók a *Penicillium*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Phoma*, *Cladosporium* nemzetségekbe tartozó penészgombák. A zöldségfélék romlásában elsősorban baktériumok játszanak szerepet, mivel gyorsabban szaporodnak, mint az élesztő- vagy penészgombák, főleg hűtött körülmények között. Gyakran izolálható baktériumok a *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Xanthomonas*, *Cromobacterium*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Micrococcus*, *Lactobacillus*, *Corynebacterium*, valamint *Bacillus* fajok.

A gyümölcsök vízaktivitása a zöldségekéhez hasonlóan nagy. Több szénhidrátot és kevesebb fehérjét, zsírt és ásványi anyagot tartalmaznak, mint a zöldségek. A gyümölcsök pH-értéke általában kisebb, mint ami a baktériumok számára kedvező, ezért a romlást okozó mikrobák elsősorban élesztő- és penészgombák. A baktériumok közül a tejsav- és az ecetsav-baktériumok jelentősek. Patogén baktériumok csak fekáliás eredetű szennyeződés által kerülhetnek a felületükre, mint például a *Salmonella*

enterica. A penészgombák között a gyümölcsök gyakori kórokozói és romlást okozói az *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Monilia*, *Sclerotinia*, *Trichotecium* fajok.

Szennyvízzel öntözött és nyersen fogyasztott zöldségek és gyümölcsök paraziták pl. a *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum*) fertőző forrásai lehetnek.

A gyakorlat menete:

A friss zöldségek (például paradicsom, paprika, uborka, retek, saláta) és gyümölcsök (például alma, barack, szilva, szőlő, eper) mikrobiológiai vizsgálata során első lépésben meghatározzuk a mezofil aerob baktériumok összcsíraszámát lemezöntéssel Nutrient táptalajon. Az inkubálás 37 °C-on 48 óráig tart.

Ezt követően különféle vizsgált baktériumok izolálására alkalmas szelektív táptalajokon (TBX Chromo Agar, Salmonella Chromo Agar, ChromoBio®Cereus Base + Cereus selective supplement, Mannitol Salt Agar, Campylobacter Blood-Free Selective Agar Base (Modified) CCDA + CCDA selective supplement, Clostridial Differential Broth) vizsgáljuk a friss zöldségek felületén általában előforduló, élelmiszer-eredetű megbetegedést okozó baktériumokat, azaz elvégezzük az *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens* baktériumok kimutatását.

A romlást okozó baktériumok közül elsősorban a *Pseudomonas* és a *Bacillus* nemzetségbe tartozó baktériumok izolálását végezzük el. A *Pseudomonas* izolálása céljából a *Pseudomonas* Isolation Agar Base táptalajt használjuk. A *Bacillus*ok kimutatása során az alapszuspenziót hőkezeljük 80 °C-on 10 percig.

A *Clostridium perfringens* kimutatása során a kémcsövekbe 10 ml szelektív táplevest és 1 ml alapszuspenziót pipetázunk, valamint paraffint teszünk. Ezt követi a hőkezelés 80 °C-on 10 percig vízfürdőben, majd gyors lehűtés a paraffin megszilárdulása céljából. Az inkubálás 44 °C-on 48 óráig történik.

A többi vizsgált baktérium esetében a szélesztést követően a Petri-csészéket inkubátorba helyezzük 48 óráig 37 °C-ra (kivétel a *Campylobacter jejuni* kimutatása esetén, amikor az inkubálás 42 °C-on történik).

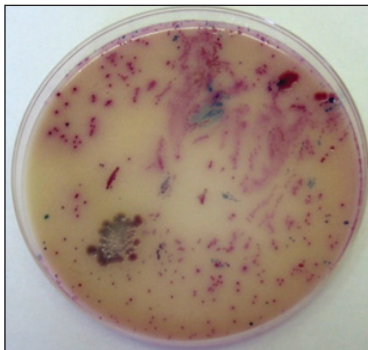
Az élesztőgombák és penészgombák esetében az inkubálási hőmérséklet 30 °C, időtartama 3-5 nap. A leoltás az alapszuspenzióból szélesztéssel történik Czapek Dox táptalaj felületére.

Eredmények és értékelés:

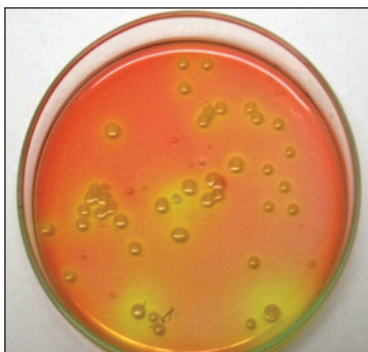
A tenyésztési időtartam eltelte után megfigyeljük a szelektív táptalajokon kifejlődött jellegzetes alakú telepeket, meghatározzuk a csíraszámot 1 g zöldség- és gyümölcsmintára vonatkozóan (41. ábra, 42. ábra). A *Clostridium perfringens* esetében a folyékony tenyészet feketére színeződik, és a paraffin megemelkedése gáztermelésre utal.

A kapott eredmények (csíraszám és a kifejlődött baktériumok típusa) alapján értékeljük a vizsgált minták mikrobiológiai minőségét. Határozzuk meg, hogy melyek a domináns mikroorganizmusok a zöldségek és a gyümölcsök esetében.

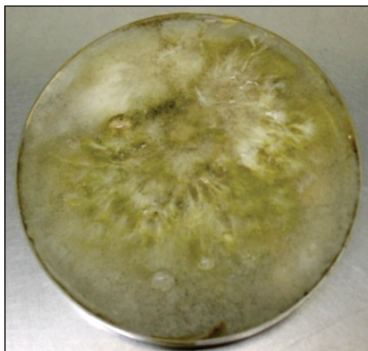
A mikroszkopikus penészgombák (43. ábra) esetében natív mikroszkópi preparátumot is készítsünk a mikotoxinogén penészgombák beazonosítása céljából.



41. ábra. Kifejlődött *Salmonella*-telepek szelektív táptalajon a retek minta esetében



42. ábra. Brokkoliról kimutatott *Staphylococcus aureus* baktériumok



43. ábra. Paradicsom mintáról származó penészgombák Czapek Dox táptalajon

18. KONZERVEK MIKROBIOLÓGIAI VIZSGÁLATA

A laborgyakorlat célja:

A konzervek mikrobiológiai minőségének vizsgálata, a romlás tüneteinek felismerése és a konzervekben előforduló mikroorganizmusok kimutatása.

Elméleti háttér:

A konzervek a legjobban eltartható élelmiszerek csoportjába sorolhatók, mégsem tekinthetők teljesen sterilnek, mivel nem teljesen mentesek minden életképes mikroorganizmustól. A gyakorlatban a kereskedelmi sterilitásra törekednek az élelmiszer-előállítók, ami azt jelenti, hogy a termékben előfordulhatnak túlélő mikroorganizmusok, amelyek laboratóriumi körülmények között kitenyészthetők, a konzervben azonban nem képesek szaporodni. A mikrobiológiailag stabil konzerv csak nyugvó állapotú baktérium-endospórákat tartalmazhat. Átlagosan megengedett határérték 100 spóra/g élelmiszer. Vegetatív baktériumsejt vagy élesztőgomba a kereskedelmi steril konzervben nem maradhat.

A sterilizálás 100 °C-nál magasabb hőmérsékleten történik, a hőmérsékleti értéket pedig úgy határozzák meg, hogy a toxintermelő spórás baktériumok elpusztuljanak. Referenciának a veszélyes toxinképző spórás *Clostridium botulinum* baktériumot szokták venni, melynek az inaktiválásához szükséges hőkezelés: 120 °C, 4-10 percig. Szubletális hősök hatására a spórák nehezebben csíráznak ki, a termofil baktériumok viszont jól tudnak fejlődni kisebb hőmérsékleteken is, mint a számukra optimális érték.

A sterilizált konzervek két csoportba sorolhatók: abszolút steril konzervek és kereskedelmi steril konzervek. Az abszolút steril konzervek esetében a sterilizálás magas hőmérsékleten hosszabb ideig történik. Az alkalmazott hőmérséklet változásokat idéz elő a termékben, csökkenti annak minőségét. Ezekre a konzervekre jellemző a vegetatív formák és a spórák teljes hiánya, a mikrobatoxinok hiánya, a mikrobiális és szöveti enzimek inaktiválása. A kereskedelmi steril konzervek tartalmazhatnak hőrezisztens spórákat, de ezek nem tudnak kicsírázni a tárolási hőmérsékleten. Ezek a konzervek nagymértékben megtartják az érzékszervi tulajdonságaikat és a tápértéküket, nem tartalmaznak az ember egészsége szempontjából káros mikroorganizmusokat és toxinokat, normál tárolási körülmények között stabilak (a hőmérséklet alacsonyabb, mint 25 °C, ami befolyásolja a mikroorganizmusok fejlődését).

A konzervek romlása összefüggésben van a termék összetételével és a pH-val. A 4,5-nél nagyobb pH-jú (5,3-7) konzervekben sima-savas romlást okozhat a *Bacillus stearothermophilus*, puffadásos romlást a *B. polymixa*, a *B. cereus*, a *B. subtilis* és az anaerobok közül a *Clostridium thermosaccharolyticum*, a *C. sporogenes*. A kis savasságú konzervekben előfordulhat a toxintermelő baktériumok

(*Clostridium botulinum*, *C. perfringens*) fejlődése is. A savas konzervekben ($\text{pH} < 4,5$) sima-savas romlást okozhat a *Bacillus coagulans*, valamint puffadással járó romlást a *C. pasteurianum* és a *C. nigrificans*.

A savas és nem savas konzervek közötti határértéket a $\text{pH} = 4,5$ képviseli, mivel egyes *Clostridium botulinum* törzsek képesek fejlődni és toxint termelni 4,6-os pH -értéken, a *Clostridium thermosaccharolyticum* képes fejlődni és romlást okozni a kis savasságú konzervekben ($\text{pH} = 4,5\text{--}5,0$).

A konzervek romlását két gyártástechnológiai hiba okozhatja: a mikrobák túlélése elégtelen hőkezelés miatt és az utószennyeződés tökéletlen zárás miatt. A romlás gyakran külső jelek alapján is felismerhető: gázképződés miatt a konzerv fedőlapja megemelkedik, a dobozok deformálódnak. Máskor külső elváltozás nincs, de a konzerv tartalmában szag-, szín-, íz- és állománybeli romlás jelentkezik. A romlás oka gyakran a zárás, a tartály hibájában rejlik és viszonylag könnyen felismerhető. Ha a zárás hibás, beszivároghat a hűtővíz, ami mikrobás szennyeződést hordozhat. Erre a mikrobiota vegyes összetételéből, a vegetatív baktériumok és élesztőgombák jelenlétéből lehet következtetni.

A húskonzervekben hőkezeléssel elpusztítják a vegetatív sejteket, a *Clostridium botulinum* spóráit és a nála nagyobb hőrezisztenciájú spórások egy részét. A termékeket lezárt konzervdobozba, üvegbe, fémfóliába vagy műanyagba csomagolják, és a csomagolást követően hőkezelik. A spórások fő forrása általában nem a higiénikusan kezelt hús, hanem az adalékanyagok, például a fűszerek.

A jól zárt és sterilizett konzerv eltarthatóságát csak spórás baktériumok veszélyeztethetik, amelyek túlélhetik a hőkezelést. Idetartoznak a leghőttűrőbb termofil spórások, például a *Bacillus stearothermophilus*, *Clostridium thermosaccharolyticum*. Előfordulásuk azért veszélyes, mert a romlás nem mindig jár gázképződéssel (sima savanyodás) és a 37 °C -os tartóssági próba alatt nem indulnak fejlődésnek, ezért a romlás felismerése nem könnyű. A termofil spórás baktériumok a konzervekbe kerülhetnek nyersanyaggal vagy a gyártóvonal valamely részéből. Leggyakoribb szennyezési forrásaik a fűszerek és a cukor.

A munka menete:

A vizsgálat előtt a doboz felnyitásra kerülő részét csíráatlanítjuk (pl. lelángolással vagy 60%-os etanollal).

Egyszerű gázelemzést is végzünk. Átszúrjuk a doboz fedelét, és a nyíláshoz parázsló gyufaszálat tartunk. A kiáramló gáztól lánggra lobbán, ha az hidrogénből áll. Ez kémiai eredetű romlásból is származhat, ilyenkor a fémdoboz fala is korródált. A mikrobiális romlásnál elsősorban CO_2 keletkezik, hidrogén nem mindig és nem tisztán.

Ha a doboz tömítetlenségének a gyanúja merül fel, akkor a kritikus helyekről (fedél és talpszegély, palástvarrat körüli részek) kell mintát venni és mikroszkópos vizsgálatot is lehet végezni. Ha elégtelen hőkezelésre gyanakszunk, akkor a doboz termikus középpontjából veszünk mintát.

A mikrobiológiai vizsgálatok során első lépésben meghatározzuk a mezofil aerob baktériumok összcsíraszámát lemezöntéssel. Ehhez 1 g mintát összekeverünk 9 ml hígítófolyadékkal, és hígítási sort készítünk 10^{-2} -ig. Az alapszuspenzióból és a hígításokból 1-1 ml-t pipettázunk steril Petri-csészékbe, majd 40-50 °C-ra visszahűtött Nutrient táptalajt töltünk rájuk és alaposan összekeverjük. A táptalaj megszilárdulását követően a Petri-csészéket termosztátba helyezzük 37 °C-ra 48 óráig.

Az aerob és anaerob spórás baktériumok kimutatását szélesztéssel végezzük. Az alapszuspenziót és a hígításokat 10 percig 80 °C-ra vízfürdőbe helyezzük, majd ezt követően 0,1 ml-t szélesztünk ki belőlük steril szélesztőbot segítségével Nutrient táptalajok felületére. Az anaerob spórás baktériumok tenyésztése anaerob dobozban történik. Az inkubálás 37 °C-on 48 óráig tart.

A termofil spórás baktériumok kimutatása céljából az alapszuspenziót 5 percig 100 °C-on hőkezeljük. Ezt követően leoltunk szélesztéssel Nutrient táptalajt tartalmazó Petri-csészékbe. Az inkubálás 55 °C-on 2 napig tart. Az anaerob spórás baktériumok tenyésztése ez esetben is az anaerob dobozokban történik.

Az élesztőgombák jelenlétének kimutatása során az alapszuspenzióból szélesztéssel leoltunk Hefe-glucose agar felületére. Ezt követi az inkubálás 30 °C-on 3 napig.

Eredmények és értékelés:

Az alkalmazott módszernek megfelelően meghatározzuk a mezofil aerob baktériumok, az aerob és anaerob spórás baktériumok, az aerob és anaerob termofil spórás baktériumok és az élesztőgombák számát. A kapott eredmények alapján (a mikrobák száma és típusa) értékeljük a vizsgált konzerv mikrobiológiai minőségét, valamint következtetni lehet a romlás kiváltásának az okára is (pl. elégtelen hőkezelés, utószennyeződés).

19. SÜTŐIPARI TERMÉKEK MIKROBIOLÓGIAI VIZSGÁLATA

A laborgyakorlat célja:

A különféle sütőipari termékek mikrobiológiai biztonságának a vizsgálata, a lehetséges allochton mikroorganizmusok kimutatása.

Elméleti háttér:

A kenyér sok változatban készülő sütőipari termék, különböző gabonafélék lisztjéből, adalékanyagok és 1-6% élesztő hozzáadásával készül. A kenyeret a sütés tartósítja. A kenyéren megjelenő mikroorganizmusok száma és típusa függ a gyártási környezet, valamint a használt eszközök higiéniai állapotától. A mikrobák származhatnak a különféle szennyeződéseket hordozó összetevőkből is, valamint kiemelkedő fontosságú a személyzet higiénája is.

A kenyér betegségei három fő kategóriába csoportosíthatók: mikroszkopikus gombák okozta elváltozások, nyúlósodás, valamint ízhibák. A kenyér romlását okozó mikroorganizmusok a következő nemzetségekbe sorolhatók: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Claviceps*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Candida*, *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*. A baktériumspórák a lisztből vagy az eszközökről származnak, túlélnek a sütést és 1-2 napon belül kicsíráznak. Ugyanakkor extracelluláris amilázokat és proteázokat termelnek, és megváltoztatják a kenyér összetételét, textúráját. A magas nedvességtartalom a kenyérbélben, a lassú hűtés és a $\text{pH} > 5$ kedvez a kenyér romlásának. A *Bacillus licheniformis*, *B. pumilus*, *B. megaterium*, *B. cereus*, *B. clausii*, *B. firmus*, *B. amyloliquefaciens* nyúlósodást okoznak. Magas nedvességtartalmú közegben tárolt kenyér felületén elszaporodhat a *Serratia marcescens* baktérium, vörös telegeket képezve („véres kenyér”). Íz- és illathibákért felelősek a különféle *Lactobacillus* fajok: *L. plantarum*, *L. curvatus*, *L. casei*, *L. farciminis*, *L. alimentarius*, *L. sanfranciscensis*, *L. fermentum*, *L. brevis lindneri*, *L. fructivorans*, *L. buchneri*, *L. acidophilus* és más génezetekbe tartozó baktériumok: *Pediococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weisella*. Élesztőgombák elszaporodása esetén a kenyér felületén fehér vagy rózsaszínű foltok figyelhetők meg. A kenyérbél nagyobb víztartalmával szemben a héj csak 16% nedvességet tartalmaz, ez nagyrészt védelmet nyújt a penészedés ellen. A szeletelt és csomagolt kenyéren a penészgombák már könnyebben elszaporodnak. Egyes penészgombafajok esetében nagy jelentőséggel bír a mikotoxintermelés.

A töltött sütemények vagy különböző magvakkal ízesített pékáruk mikrobiológiai romlása gyakoribb. Nagyobb nedvességtartalomnál a *Bacillus cereus*, a *Staphylococcus aureus* vagy *Escherichia coli* baktériumok okozta élelmiszer-

mérgezés vagy -fertőzés fordulhat elő, amelyeket elsősorban a krémmel töltött sütemények okozzák. Különös figyelmet igényelnek a tojással készült termékek, a krémmel, tejszínnel ízesített cukrászsütemények. Ezeket a rövid eltarthatósági idő alatt is hűtve kell tárolni. Ezeknél a süteményeknél a *Salmonella enterica* és a *Staphylococcus aureus* jelenlétére lehet számítani.

A gyakorlat menete:

A gyakorlat során a kereskedelemben forgalmazott, véletlenszerűen kiválasztott különböző típusú kenyerek és más sütőipari termékek, krémes sütemények mikrobiológiai vizsgálatát végezzük. Az alapszuszpenzió készítése során kimérünk 10 g mintát és hozzáteesszük 90 ml hígítófolyadékhoz, majd homogénező segítségével alaposan összekeverjük. A kapott alapszuszpenzióból hígítási sort készítünk a 10^{-2} hígításig, krémes sütemények esetén 10^{-4} ig.

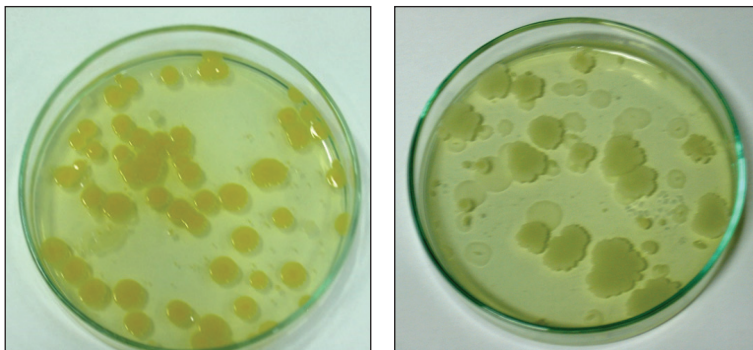
Ezt követően lemezöntéssel meghatározzuk a mezofil aerob baktériumok összcsíraszámát Nutrient táptalajon. Tenyésztési mikrobiológiai eljárásokkal mutatjuk ki az aerob spórás baktériumokat (*Bacillus cereus*), az anaerob szulfiteredukáló spórás baktériumokat (*Clostridium perfringens*), az *Escherichia coli* és a *Staphylococcus aureus* (a nem megfelelő higiéniai körülmények esetén a kenyérre és más sütőipari termékekre rákerülő baktériumok), valamint a penészgombákat a megfelelő szelektív táptalajokon.

Krémes sütemények esetén a *Salmonella* sp. jelenlétének a kimutatását is elvégezzük szélesztéssel, XLD táptalajt használva az izoláláshoz.

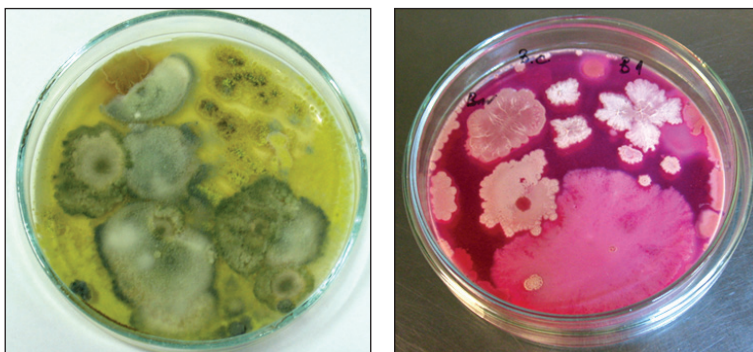
A *Bacillus cereus* és a *Clostridium perfringens* kimutatása során az alapszuszpenziót hőkezeljük 80 °C-on 10 percig. Az inkubálás a mezofil aerob baktériumok, a *Bacillus cereus*, az *Escherichia coli*, a *Staphylococcus aureus*, a *Salmonella* sp. esetében 37 °C-on 48 óráig történik, a *Clostridium perfringens* esetében 44 °C-on 48 óráig, a mikroszkopikus gombák esetében 28 °C-on 3-5 napig.

Eredmények és értékelés:

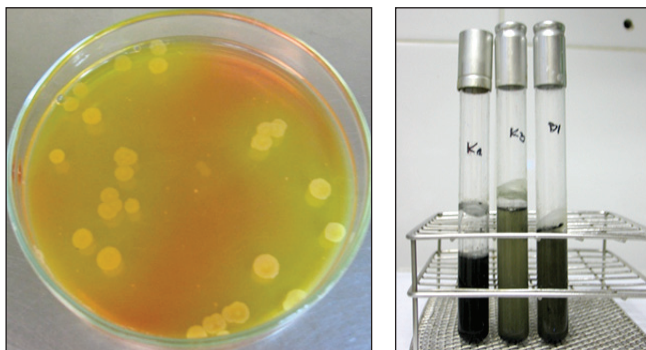
A kifejlődött baktériumok és mikroszkopikus penészgombák típusa és száma alapján értékeljük a vizsgált termékek mikrobiológiai minőségét, a lehetséges szennyeződési forrásokat (44. ábra, 45. ábra, 46. ábra). A mikroszkopikus penészgombák esetében natív preparátumot is készítünk a beazonosítás céljából.



44. ábra. Kenyermintákból kifejlődött mezofil aerob baktériumok Nutrient táptalajon



45. ábra. Kenyermintákból izolált penészgombák és aerob spórás baktériumok



46. ábra. Kenyermintákból kifejlődött *Staphylococcus* sp. baktériumok és *Clostridium perfringens* pozitív minta

20. HÚSOK ÉS HÚSKÉSZÍTMÉNYEK MIKROBIOLÓGIAI VIZSGÁLATA

A laborgyakorlat célja:

A különféle húsokon és húskészítményeken előforduló romlást okozó és élelmiszer-eredetű megbetegedést okozó baktériumok kimutatása.

Elméleti háttér:

A hússzövet számos tápanyagot (például glikogén, aminosavak, fémionok stb.) tartalmaz, ezért ideális tápközeg a baktériumok és egyéb mikroorganizmusok számára. A húson előforduló mikroorganizmusok nemcsak romlást okozhatnak, hanem a fogyasztók egészségét is veszélyeztethetik. Az allochton mikroorganizmusok az előállítás, feldolgozás és forgalmazás során szennyezhetik vagy fertőzhetik a húst.

A húst szennyező mikroorganizmusok elsődleges forrásai a kültakaró és a béltraktus. A kültakarón főként a *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Pseudomonas* nemzetségekbe tartozó fajok, élesztő- és penészgombák találhatók, melyek mellett még fekáliás és talaj eredetű mikroorganizmusok is előfordulhatnak. További szennyeződés eredhet a feldolgozóüzemi környezetből, a feldolgozóeszközökről, edényekről, a dolgozók kezéről, ruházatáról. A feldolgozott hústermék előállítása során használt adalékok (például fűszerek, pácsók) minősége is befolyásolhatja a termék mikrobiológiai minőségét. A húsok romlását okozó baktériumok proteolitikus és lipolitikus enzimeket termelnek.

A higiénikusan előkészített húsban a patogén mikrobák száma nagyon alacsony, a mikrobiotát elsősorban szaprobionta fajok alkotják. A legnagyobb számban Gram-negatív pálcá alakú baktériumok (*Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Moraxella* nemzetségek, enterobaktériumok) és Gram-pozitív kokuszok (*Micrococcus* és *Staphylococcus* fajok) fordulnak elő. A húsok mikrobiotájának patogén képviselői is lehetnek, például a *Salmonella enterica*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum*, *C. perfringens*, *Vibrio cholerae*. Hogy a kezdeti mikroorganizmusok közül melyek válnak dominánssá, a későbbi feldolgozástól és tárolástól függ.

A baromfihús tulajdonságainak köszönhetően szintén megfelelő táptalaj a mikroorganizmusok számára. Romlását leggyakrabban a *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Moraxella* fajok és a *Schewanella putrefaciens* okozza. A romlás főleg a bőr felszínén jellemző, szag-, nyálkaképződéssel és elszíneződéssel jár. A baromfihúson leggyakrabban előforduló patogén baktériumok a *Salmonella enterica*, a *Campylobacter jejuni* és a *Listeria monocytogenes*.

A nem megfelelően feldolgozott, élelmiszerként fogyasztott vadhús szalmonellózist okozhat és paraziták (tichinella, galandférgek) terjesztője lehet.

A halhúson számos veszélyes humánpatogén baktérium (*Salmonella*, *E. coli*, *C. botulinum*, *L. monocytogenes*) előfordulhat, de megfelelő feldolgozás, tárolás esetén a gyorsan romlandó halhús sem okoz élelmiszer-eredetű megbetegedést.

A húsok és húskészítmények tartósítására különféle eljárások léteznek, mint például hűtés, fagyasztás, hőkezelés (főzés, gőzölés, pasztörözés, sterilizálás), sózás, pácolás, füstölés, kémiai tartósítás, módosított atmoszférás csomagolás stb.

A húskészítmények termékcsoportja az összetétel és az előállítási technológia következtében nagyon változatos, ezért a mikrobiológiai tulajdonságaik is különbözők. A vörösrúk és felvágottak esetében a romlás leggyakoribb oka a nem megfelelő hűtőtárolás, ami a bélben töltött termékeken felületi nyálkásodást okoz. A pácolt termékekben a patogén mikroorganizmusokat a só, a nitrit, a pH és az alacsony hőmérséklet kombinációja gátolja. Szárított, pácolt sonkatermékek romlását *Clostridium*ok okozhatják a csont közelében. A fermentált kolbászfélések változatos összetételük miatt az egyik legszélesebb körű mikrobiotával rendelkeznek. A húson kívül szennyező forrást jelenthetnek például a fűszerek, ízesítőanyagok, a nem megfelelően tisztított természetes bél. A csomagolás után pasztörözött termékek (kolbászok, pástétomok) romlása a túlélő mikroorganizmusoktól (mikrokokuszok, enterokokuszok, laktobacillusok, *Brochothrix thermosphacta*) és a tárolási körülményektől függ. A pasztörözött hústermékeknél a legjelentősebb patogén baktérium, amely előfordulhat, a *Clostridium perfringens*.

A gyakorlat menete:

A gyakorlat során a kereskedelemben forgalmazott különféle friss húsok (például baromfi-, sertés- és szarvasmarhahús) és húskészítmények (például felvágottak, fermentált kolbászok és szalámik, pácolt termékek, pástétomok) mikrobiális szennyezettségét vizsgáljuk mikrobiológiai tenyésztési módszerekkel.

Első lépésben meghatározzuk a mezofil aerob baktériumok összcsíraszámát lemezöntéssel. A vizsgált mintából alapszuszenziót (10 g minta + 90 ml hígítófolyadék), majd az alaposan homogenizált alapszuszenzióból hígítási sort készítünk 10^{-4} -es hígításig. A megfelelő hígításokból az előre előkészített steril Petri-csészékbe aseptikusan 1-1 ml-t pipetázunk. Ezután az autoklávozással sterilizált, majd 45-50 °C-ra visszahűtött Nutrient táptalajból 15-15 ml-t töltünk minden Petri-csészébe, majd óvatos körkörös mozgattal elkeverjük az inokulumot a táptalajban, és hagyjuk megszilárdulni. Az inkubálás 37 °C-on történik 48 óráig.

Ezt követően a vizsgált friss húsok felületén és a húskészítményekben előforduló élelmiszer-eredetű megbetegedést okozó baktériumok (*Salmonella* sp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*) és a romlást okozó baktériumok (*Pseudomonas*, tejsavbaktériumok) kimutatását végezzük szélesztéssel, különféle szelektív táptalajokon.

A vizsgálatok során a következő szelektív táptalajok használhatók: Brilliance Salmonella Agar Base, ChromoBio TBX Agar, Mannitol Salt Agar, ChromoBio Cereus

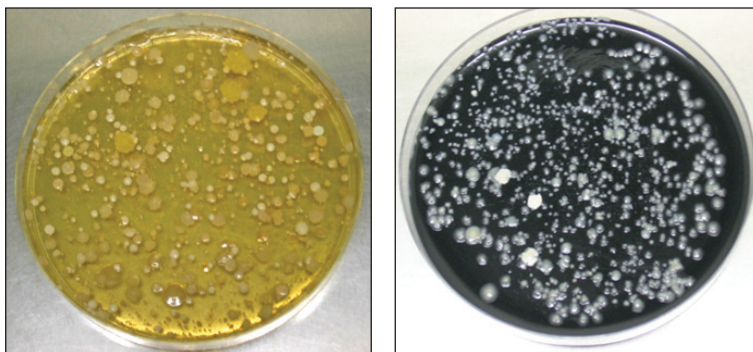
Base, Campylobacter Blood-Free Selective Agar, valamint Pseudomonas Selective Agar és MRS Agar.

Az inkubálás 37 °C-on 48 óráig történik, kivétel a *Campylobacter jejuni* tenyésztése, amely esetében az inkubálási hőmérséklet 42 °C.

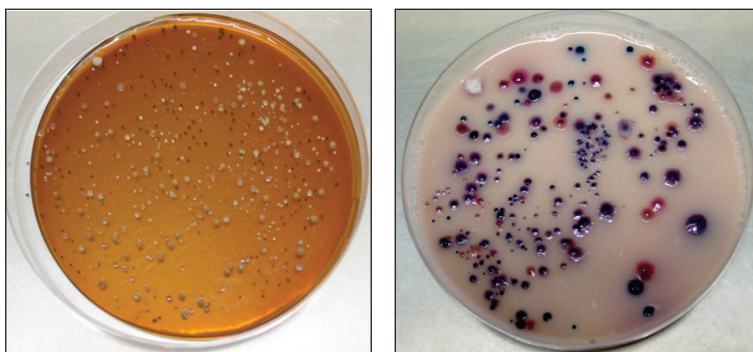
Eredmények és értékelés:

Az inkubálást követően megszámoljuk a kifejlődött baktériumtelepeket, és az alkalmazott tenyésztési eljárásnak (lemezöntés, szélesztés) megfelelően meghatározzuk a mezofil aerob baktériumok, valamint az élelmiszer-eredetű megbetegedést okozó és a romlást okozó baktériumok számát (TKE/g) (47. ábra, 48. ábra).

A kapott eredmények alapján következtetést vonunk le a vizsgált hús- és húskészítményminták mikrobiológiai minőségére vonatkozóan. A kifejlődött baktériumok típusa alapján feltételezhető, hogy milyen szennyeződési forrásból származhatnak a mikroorganizmusok, utószennyeződés vagy a nem megfelelő tartósítás az oka a baktériumok jelenlétének adott húskészítményekben.



47. ábra. Csirkecomb mintáról származó mezofil aerob baktériumok és sertés darálthúsból kifejlődött *Campylobacter jejuni* telepek szelektív táptalajon



48. ábra. Baromfihúsról kifejlődött tejsavbaktériumok MRS táptalajon és *Salmonella* baktériumok Brilliance *Salmonella* Agar Base szelektív táptalajon

21. IVÓVÍZ MIKROBIOLÓGIAI VIZSGÁLATA

A laborgyakorlat célja:

Különféle vízminták mikrobiológiai minőségének vizsgálata, ivóvízként fogyasztásra való alkalmasságának kimutatása.

Elméleti háttér:

A természetes vizekben található baktériumok eredet szerint általában három csoportba sorolhatók: természetes mikrobiota (például *Spirillum*, *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Chromobacterium* fajok), talajbaktériumok (például *Bacillus*, *Streptomyces*, *Aerobacter* fajok) és fekális eredetű baktériumok (például *Escherichia coli*, *Streptococcus faecalis*, *Clostridium perfringens*). A víz eredeti, autochton mikrobaszáma függ a forrástól, a rétegektől, amelyeken keresztül a felszínre jut, az ásványianyag- és oxigéntartalomtól. A víz mikroorganizmusai általában aerobok és pszichotrófok, jellemző rájuk, hogy a szaporodáshoz kevés nitrogént és más szerves anyagot igényelnek. Ha szennyeződés nem éri a vizeket, kórokozóktól mentesek.

Az élelmiszeriparban a gyártáshoz felhasznált vagy a gyártás során a termékkel, illetve az alkalmazott edényekkel, eszközökkel érintkezésbe kerülő víznek, az ivó- és háztartási célokra használt víznek, természetes és mesterséges ásvány- és gyógyvíznek, jég előállításához felhasznált víznek ivóvíz minőségűnek kell lenni.

Ivóvizeinkben sem kórokozó baktériumok, sem a fekáliás szennyeződés bakteriológiai vagy kémiai nyomai nem lehetnek. A fekáliás eredetű szennyeződés, amelyben baktériumokat, vírusokat és parazitákat egyaránt izoláltak, a megbetegedések leggyakoribb okozója az ivóvízben.

A mintavételezés steril üvegedényekbe kell történnjen. A minta feldolgozását legcélszerűbb a mintavétel után azonnal elkezdni. Ha ez nem lehetséges, akkor hűtés nélkül 2 órán belül, hűtőben tartva 24 órán belül kell elkezdni a vizsgálatokat.

Szivattyús kútból vagy vízvezetéki csapból történő mintavételnél a vizet előbb 5 percig folytatni kell, majd a kifolyó csövet denaturált-szeszes vattatamponnal alaposan lekenni és lelángolni. Ezután a vizet addig folytatni, amíg a cső le nem húll. A steril üveget kiöblítés nélkül megtöltjük és steril dugóval bezárjuk.

Az ivóvíz mikrobiológiai jellemzéséhez leggyakrabban alkalmazott vizsgálati eljárások: a mezofil baktériumszám meghatározása, a koliszám meghatározása, a fekálkoli kimutatása és az anaerob szulfitredukáló baktériumok kimutatása.

A mikrobiológiai minőségre vonatkozó elvárások szerint a palackozott vizek megengedett mezofil aerob baktériumszáma cm^3 -enként 20, pszichotróf baktériumszáma pedig 100 lehet (22, illetve 37 °C-os tenyésztés után). A víz nem tartalmazhat koliform baktériumokat, enterokokkusokat, *Pseudomonas aeruginosa*t, *Escherichia coli*t vagy más kórokozókat a víz 250 cm^3 -ben, szulfitredukáló anaerob spórás baktériumokat pedig 50 cm^3 -ben.

21.1. Ivóvíz mezofil aerob és pszichrotróf baktériumszámának meghatározása lemezöntéssel

Elméleti háttér:

A 37 °C-on fejlődő mezofil mikroorganizmusok száma az első bakteriológiai indikátor az ivóvizek mikrobiológiai vizsgálata során. Minél nagyobb ezeknek a baktériumoknak a száma, annál inkább feltételezhető, hogy köztük patogén mikroorganizmusok is előfordulnak. A 22 °C-on kitenyészthető pszichrotrófok csoportja főleg szaprotróf baktériumokat tartalmaz.

A gyakorlat menete:

A vizsgált vízmintából első lépésként hígítási sort készítünk 10^{-3} hígításig. Ezt követően a mintából és az egyes hígításokból 2-2 párhuzamban 1-1 ml-t pipettázunk steril Petri-csészékbe, majd 15 ml 45-50 °C-ra visszahűtött Nutrient táptalajjal alaposan elkeverünk. Megszilárdulás után a Petri-csészéket fordított helyzetben az inkubátorba helyezzük 48 óráig. Az inkubálási hőmérséklet a mezofil aerob baktériumok számára 37 °C, a pszichrotrófok esetében pedig 22 °C.

Eredmények és értékelés:

Az inkubálást követően a lemezöntéses élősejtszám-meghatározás módszerének megfelelően meghatározzuk a vizsgált baktériumok csíraszámát, és a szabványban előírtaknak megfelelően értékeljük a vizsgált vízminta minőségét (49. ábra).



49. ábra. *Vízmintából Nutrient táptalajon kifejlődött mezofil aerob baktériumok telepei*

21.2. A koliform baktériumok és az *Escherichia coli* kimutatása

Elméleti háttér:

A koliform baktériumok az *Enterobacteriaceae* család tagjai (például az *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*), indikátor szervezetek. A higiénés gyakorlatban azokat a fakultatív anaerob, Gram-negatív, endospórát nem képező, pálcika alakú baktériumokat nevezzük koliformoknak, amelyek a laktózt 37 °C-on sav- és gázképzés mellett 48 órán belül fermentálják. A koliformokkal azonos körülmények között tenyésztő szaprofita baktériumok könnyen elkülöníthetők a biztosan székletből származó, ún. fekális koliformoktól, mert ellentétben az utóbbiakkal a laktózt 44 °C-on már nem tudják fermentálni.

Koliliternek nevezzük azt a legkisebb vízmennyiséget, amelyből tenyésztéssel eljárással koliform szervezetet még kimutathatunk. A koliszám (koli-index) a 100 ml vízből kitenyésztendő koliform baktériumok számát jelzi.

Az *Escherichia coli* a fekáliás szennyeződés fő indikátora. Az *E. coli* fiziológiai körülmények között enterális patogenitási tulajdonsággal nem rendelkezik a bélben, a bél normál mikrobiotájának a tagja. Jellemző, hogy kromoszomális mutációra rendkívül hajlamos és az intra- és interspecies génátvitel minden formájára képes, ezért új patogén tulajdonságot nyerhet konjugációval, transzdukcióval és transzformációval. Az *E. coli* és egyes patogén törzsei a vízben hosszú ideig életképesek. A patogén törzseket speciális csoportokba sorolják virulenciatalajdonságaik, patogenitásuk mechanizmusa, az okozott klinikai tünetek alapján.

A gyakorlat menete:

A vizsgálandó vizet alaposan összerázzuk, és 1 ml-t pipetázunk kémcsövekbe (általában 10 darab kémcsövet használunk egy vízminta esetében), melyek 5 ml laktózlevest és fenolvörös indikátort, valamint Durham-csövet tartalmaznak. 5 darab kémcsövet 37 °C-ra beállított inkubátorba helyezünk a koliform baktériumok kimutatása céljából, és 5 kémcsövet 44 °C-ra a fekális koliformok meghatározására.

A koliform baktériumok kimutatását elvégezhetjük szilárd szelektív táptalaj (például ChromoBio koliform táptalaj) felületére való szélesztéssel is, ez esetben a vizsgált vízmintából hígítási sort is készítünk.

A koliszám meghatározása történhet membránszűrő technika segítségével. A 0,45 µm pórusátmérőjű steril membránszűrőn átszűrünk 100 ml vízmintát, majd a szűrőlapot steril csipesz segítségével, a szűrőfelülettel felfelé helyezzük Petri-csészében lévő differenciáló táptalaj (Endo- vagy eozin-metilénkék táptalaj) felületére. Ezt követi az inkubálás 37 °C-on 24 óráig.

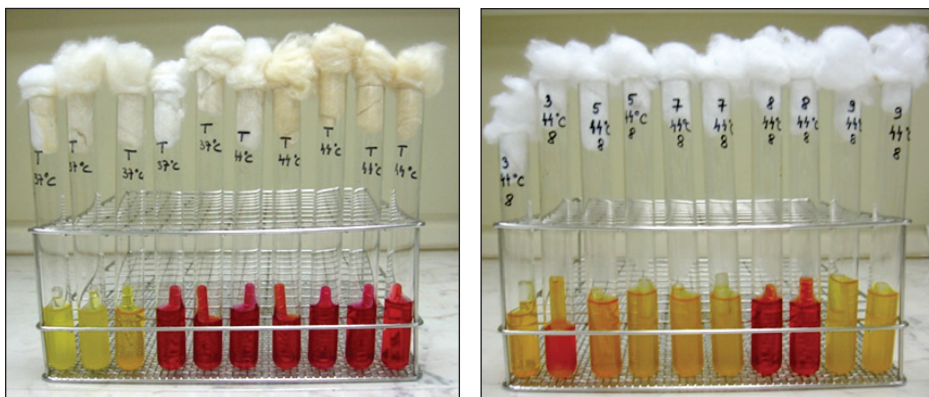
Az *Escherichia coli* kimutatását többféle módon is elvégezhetjük. A pozitív eredményt adó, fekális koliformok jelenlétére utaló tenyészetekből kiszélesztünk

Endo táptalaj felületére. Az inkubálás 37 °C-on 24-48 óráig tart. Másik eljárás esetén a vizsgált vízmintából és az abból készült hígításokból leoltunk szélesztéssel szelektív táptalaj, például TBX Chromo agar felületére, és inkubáljuk 37 °C-on 48 óráig.

Az *E. coli* esetében a megerősítés céljából elvégezhetők az IMViC-próbák: indolpróba, metilvöröspróba, Voges–Proskauer-próba (AMC = acetil-metil-karbinol képződés) és a citrátfelhasználás-próba. Az indol- és a metilvöröspróba pozitív az *E. coli* esetében.

Eredmények és értékelés:

A koliform baktériumok kimutatása során, pozitív eredmény esetén a 37 °C-on történő inkubálás után a savképződés által a folyékony tenyészet sárgára színeződik, és a Durham-csőben gázképződés figyelhető meg (50. ábra). Ha a 44 °C-on inkubált tenyészetek esetében találunk pozitív eredményt (sav- és gázképződés), akkor az a fekális koliform baktériumok jelenlétére utal.



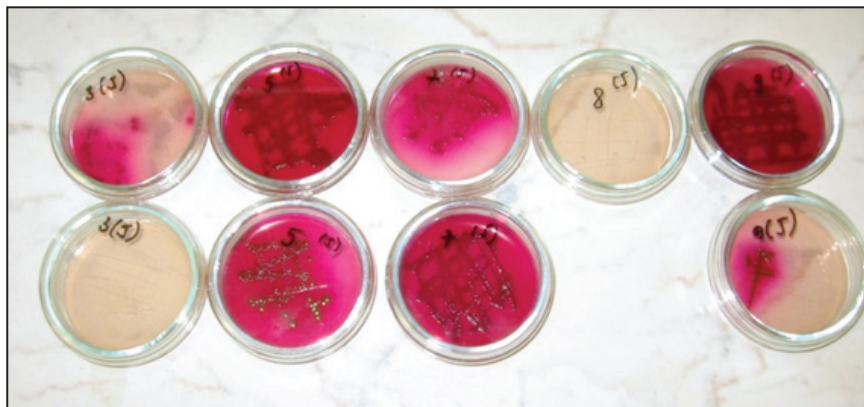
50. ábra. Koliform és fekális koliform baktériumok kimutatása laktózlevesben

Ha a koliform baktériumok kimutatása szélesztéssel történt szelektív táptalajon, akkor megszámoljuk a kifejlődött jellegzetes telepeket, és a módszernek megfelelően megadjuk a baktériumok számát 1 ml vízmintában.

A membránszűrő technika esetében az inkubálás után a koliform baktériumok telepszámának és a szűrt víz mennyiségének ismeretében határozzuk meg a 100 ml vízmintában lévő koliszámot.

Endo táptalajon az *E. coli* baktériumra jellemző telepek sötétvörös színűek és fémfényűek (51. ábra). A TBX Chromo agar esetében a telepek türkizkék színűek. Ezen a táptalajon szélesztést alkalmaztunk, ezért a módszernek megfelelően a jellegzetes telepek megszámolása után megadjuk az *E. coli* baktériumok számát 1 ml vízmintában.

A mennyiségi viszonyoktól függetlenül kifogásolandó az ivóvíz, ha belőle fekális koliform baktériumok vagy *E. coli* mutatható ki.



51. ábra. Az *Escherichia coli* jelenlétének kimutatása Endo táptalajon

21.3. Fekális eredetű *Streptococcusok* (*Enterococcusok*) kimutatása

Elméleti háttér:

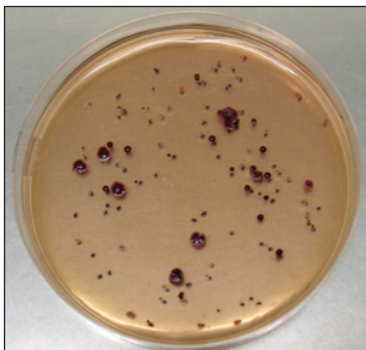
A vizek fekáliás szennyezettségének fontos indikátor-mikroorganizmusai a fekális *Streptococcusok*, amelyek rövidebb-hosszabb láncokat képező Gram-pozitív kokkusok. Egyes fajaik emberi és állati megbetegedéseket okoznak, de az egészséges szervezet is hordozhatja őket. A *Streptococcus faecalis* a külvilágban nem szaporodik, a vízben hamar elpusztul, jelenléte a víz friss fekáliás szennyeződésére utal.

A gyakorlat menete:

A vizsgált vízmintából szélesztéssel leoltunk Petri-csészébe *Enterococcus faecalis* szelektív táptalaj felületére. Az inkubálás 37 °C-on 48 óráig tart.

Eredmények és értékelés:

A fekális *Streptococcusok* jelenléte esetén a szelektív táptalaj felületén bordó-barnás színű telepek fejlődnek ki (52. ábra).



52. ábra. *Enterococcus faecalis* baktériumtelepek szelektív táptalaj felületén

21.4. Anaerob szulfitredukáló baktériumok (*Clostridium*ok) kimutatása

Elméleti háttér:

A *Clostridium* nemzetség tagjai Gram-pozitív, endospórát képező, anaerob pálcá alakú baktériumok. Széles körben elterjedtek, megtalálhatók a talajban, felszíni vizekben, szennyvizekben, de sok faj él az emberi és állati bélcsatornában is a normál mikrobiota tagjaként. A csoport egyik fő képviselője a *Clostridium perfringens*, spórás, tokkal rendelkező nem mozgó baktérium. Az emberi és állati bélcsatorna lakója, a spóra talajban, vizekben előfordulhat. Nekrotizáló és hemolizáló enterotoxinokat termel, ételmérgezést és gázgangrénát okozhat. A vízben hosszú ideig életképes marad, ezért jelenléte régi, igen erős, hosszan tartó szennyezettséget jelez.

A gyakorlat menete:

A szulfitredukáló anaerob spórás baktériumok kimutatására parafinnal lezárt *Clostridium* differenciáló táplevest használunk. A táplevest tartalmazó kémcsövekbe 1 ml vízmintát pipetázunk és paraffindarabkákat teszünk, majd vízfürdőbe helyezzük 80 °C-ra 10 percig. Ezt követően lehűtjük, majd inkubáljuk 44 °C-on 48 óráig.

Eredmény és értékelés:

Pozitív eredmény esetén az eredetileg sárgás-rózsaszínű tápleves megfeketedik, mivel a *Clostridium*ok a szulfitot fekete színű vas-szulfiddá redukálják. A megerősítő vizsgálatban a *C. perfringens* a tej alvadását váltja ki (az alvadék jellegzetes szivacsos megjelenésű) és lecitinázt termel.

21.5. A *Pseudomonas* baktériumok kimutatása

Elméleti háttér:

Az ivóvíz higiéniai vizsgálata során a *Pseudomonas*ok kimutatása is nagy jelentőséggel bír. A *Pseudomonas aeruginosa* baktérium vizekben, szennyvizekben és szennyezett ivóvizekben közönségesen megtalálható. Nem jelez friss fekális szennyeződést. Csővezetékben és tartályokban a *P. aeruginosa* kolonizációja és biofilm képzése gyakori szennyezésforrás. Opportunista patogén, általában az immungyenge egyéneknél okoz megbetegedést.

A gyakorlat menete:

A vizsgált vízmintából leoltunk szélesztéssel Brolacin táptalajra (laktózt, peptont, cisztint és bromtimolkéket tartalmaz) vagy szintén a *Pseudomonas* baktériumok izolálására alkalmas Pseudomonas Agar Base táptalajra. Inkubálás 37 °C-on 24 óráig.

Eredmények és értékelés:

Brolacin táptalaj használatakor a táptalaj felszínén nagy, kékes udvarú, barnás központú telepek jelennek meg pozitív eredmény esetén. A *Pseudomonas* Agar Base táptalajon nyákos, kékes-zöldes pigmentációjú, UV hatására fluoreszkáló telepek fejlődnek.

21.6. Ivóvízben előforduló mikroszkopikus penészgombák kimutatása

Elméleti háttér:

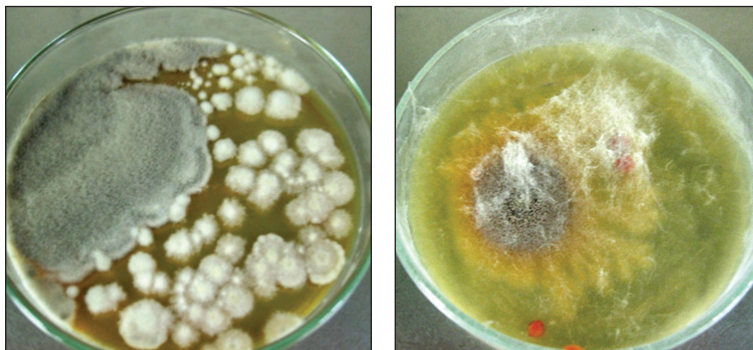
Palackozott vizek esetében elvárás a mikroszkopikus penészgombák hiánya. A penészgombák előfordulása mikotoxin-termeléssel is társulhat, ami káros az emberi egészség szempontjából.

A gyakorlat menete:

A vizsgált vízmintából leoltunk szélesztéssel Czapek Dox táptalaj felületére, majd ezt követi az inkubálás 28 °C-on 3-5 napig.

Eredmények és értékelés:

Az inkubálás után megfigyeljük a kifejlődött telepeket, meghatározzuk a telepek számát, valamint natív mikroszkópi preparátum segítségével – figyelembe véve a sejt- és telepmorfológiai tulajdonságokat – elvégezzük a penészgombák rendszertani beazonosítását határozókönyv segítségével, elsősorban a mikotoxint termelő penészgombák szempontjából (53. ábra).



53. ábra. Kútvízből és csapvízmintából kifejlődött penészgomba telepek

22. PALACKOK TISZTASÁGÁNAK A VIZSGÁLATA (ÖBLÍTÉSES MÓDSZER)

A laborgyakorlat célja:

Az élelmiszeripari célokra használt palackok esetében a belső felület mikrobaterheltségének és az alkalmazott tisztítás hatékonyságának vizsgálata.

Elméleti háttér:

Mosott palackoknál a mosó- és öblítőgép mosási hatékonyságát, nagyobb edényeknél (például kannák) a mosás-tisztítás utáni maradék mikrobaszámot határozhatjuk meg ezzel a módszerrel.

Az edénybe bemért, ismert mennyiségű steril vízbe rázzuk az edény falán maradt mikrobákat, majd hígítást és lemezöntést végzünk. Így határozzuk meg azt a sejtszámot, amely az edény teljes feltöltése esetén, annak faláról a folyadék minden ml-ét szennyezné. A steril öblítőfolyadék mennyisége az edény térfogatának 5-10%-a legyen. A bemosó hatás fokozására adhatunk az öblítővízbe 0,2% steril kvarchomokot.

A gyakorlat menete:

A palackba 50 ml steril vizet töltünk, lelángolt parafadugóval bedugjuk, és erőteljes rázással 4-5 percen keresztül rázzuk. A palackban lévő folyadékból hígítást készítünk 10^{-4} -ig. A folyadékból és a hígításokból leoltunk Nutrient táptalajra lemezöntéssel a mezofil aerob baktériumok, valamint szélesztéssel Czapek Dox táptalajra a mikroszkopikus gombák (élesztő- és penészgombák) kimutatása céljából. A baktériumok esetében az inkubálás 37°C -on 48 óráig, a mikroszkopikus gombák esetében 28°C -on 3-5 napig tart.

Eredmények és értékelés:

A Nutrient táptalajon fejlődött telepekből a mezofil aerob mikrobaszámot, a Czapek Dox táptalajon fejlődött telepekből pedig az élesztő- és penészgombaszámot állapítjuk meg.

A palacktérfogat 1 ml-ére eső számot a következőképpen kapjuk meg:

$$\frac{\text{Telepszám átlag} \times \text{bemért folyadék (ml)}}{\text{Palacktérfogat (ml)}} = \text{mikrobaszám/ml}$$

A palack ml-kénti mikrobaszámára vonatkozóan általában elfogadott érték: 2-3 db sejt/ml. Újabban a megengedhetőnek tartott szám 500 ml-es palackra vonatkoztatva a 6. táblázat szerint alakul.

6. táblázat. *A tisztítás hatékonyságának megállapítása a mikrobaszám alapján*

Sejtszám	Értékelés
<100	nagyon tiszta
100–500	jól tisztított
500–1500	kielégítően tiszta
>1500	nem kielégítően tiszta

23. ÉLELMISZEREKBŐL IZOLÁLT BAKTÉRIUMOK MEGHATÁROZÁSÁHOZ HASZNÁLT BIOKÉMIAI MEGERŐSÍTŐ VIZSGÁLATOK

A baktériumok azonosításakor – a morfológiai és tenyészeti jellegzetességek mellett – a biokémiai tulajdonságaikat is figyelembe veszik. A biokémiai tesztek elvégzésekor általában speciális táptalajokat használnak, melyek tartalmazzák az elbontandó szubsztrátumot. Az alábbiakban az általános mikrobiológia laborgyakorlatokon elsajátított és az élelmiszer-mikrobiológia laborgyakorlatok során is alkalmazott legfontosabb megerősítő vizsgálatokat említjük meg.

23.1. A mikroorganizmusok szénhidrát-hasznosító tulajdonságainak kimutatása

Számos baktériumfaj képes a szénhidrátok elbontására, miközben savak, gáz (CO_2 , H_2 , CH_4), aldehidek és alkoholok képződnek. A szénhidrátbontó tulajdonságok vizsgálata céljából a baktériumokat folyékony vagy szilárd táptalajon tenyésztik, a táptalajhoz szénhidrátot és egy indikátor anyagot adnak.

23.1.1. A szénhidrátbontó tulajdonságok vizsgálata peptonvízben kék-bromtimollal

A peptonvizet tartalmazó kémcsövekbe (9 ml/kémcső) steril körülmények között 1 ml 10%-os szénhidrátoldatot (például glükóz-, fruktóz-, szacharózoldatot) teszünk. Beoltjuk a vizsgált baktériumokkal, egy kémcső kivételével, hogy azt mintaként (kontrollként) használhassuk. Ezt követi az inkubálás 24-48 óráig, 28 °C-on. A beoltott és a mintaként használt kémcsöveket egyaránt termosztátba helyezük. Inkubálás után a kémcsövekbe 0,5 ml kék-bromtimolt teszünk. A kék szín eltűnése a szénhidrátok metabolizálására utal (savas pH kialakulása).

23.1.2. Baktériumok laktózerjesztésének vizsgálata

Számos baktérium képes a laktózt mint szénforrást anaerob körülmények között felhasználni. Ez a folyamat az erjesztés, melynek során különböző savak keletkeznek. Egyes baktériumok a savak mellett szén-dioxidot is termelnek a laktóz

erjesztése alkalmával. Ilyenek a bélbaktériumok is, amelyek kimutatásában, azonosításában a laktózerjesztési próba fontos vizsgálatot jelent. A laktóz erjesztése során keletkező savakat a táptalajhoz adagolt pH-indikátorral mutatjuk ki, míg a gázképződést Durham-cső segítségével figyelhetjük. Az inkubálás 37 °C-on történik 2 napig.

23.1.3. Metilvörös reakció

A teszt a glükóz fermentációja során képződő H^+ -ionok koncentrációjának a kimutatására szolgál. Számos enterobaktérium, Gram-negatív baktérium elkülöníthető a glükóz fermentációja során képződött végtermékek alapján.

Az *Escherichia*, *Salmonella*, *Proteus*, *Aeromonas* nemzetségbe tartozó baktériumok esetében a glükóz erjesztése során savak (tejsav, ecetsav, hangyasav, borostyánkősav), CO_2 és H_2 képződik. Savak felhalmozódása során a közeg pH-értéke 5-re vagy az alá csökken. Ha egy ilyen tenyészethez metilvörös reagenst adunk, vörösre színeződik, bizonyítva, hogy az adott baktérium képes fermentálni a glükózt különféle savképződés mellett.

A vizsgált baktériumokat leoltjuk Clark-Lubs táplevesbe, melynek összetétele: pepton 5 g, glükóz 5 g, K_2HPO_4 5 g és 800 ml desztillált víz. 3-4 napig tartó 28 vagy 37 °C-on történő inkubálást követően 5 csepp reagenst teszünk a tenyészeteket tartalmazó kémcsövekbe. Pozitív reakció esetén vörös vagy rózsaszín színeződés figyelhető meg, ami magas H^+ -ionkoncentrációra utal, a sárga színeződés pedig negatív reakciót jelent. Az *Escherichia coli* mintabaktériumként használható, mivel pozitív reakciót mutat.

23.2. A baktériumok fehérjebontó képességének a kimutatása

23.2.1. Zselatinolízis teszt

A vizsgált baktériumokat zselatintartalmú táptalajba oltjuk oltótű segítségével, majd 12 napig inkubáljuk 20-22 °C-on. Pozitív eredmény esetén a baktérium által kiválasztott zselatináz hatására a zselatin elfolyósodik.

23.2.2. A triptofán hidrolízise

Egyes baktériumok a fehérjék lebontása során keletkező triptofánból indolt képeznek. A keletkező indolt tovább már nem metabolizálják, így az a tápleves-

ben felhalmozódik. A keletkezett indolt p-dimetilamino-benzaldehid segítségével (Kovács-reagens) mutatjuk ki.

A triptofán lebontására csak a mikroorganizmusok egyes csoportjai képesek, ezért ezt a tulajdonságot is fel lehet használni diagnosztikai célokra. Az indolképzési reakció a bélbaktériumok faj szerinti azonosításában alapvető fontosságú. A vizsgálathoz szénhidrátmentes tápközeget kell használni, mert szénhidrátok jelenlétében az aminosavak energiaforrásként történő hasznosítása háttérbe szorul, és a triptofán lebontása nem következik be kimutatható mértékben.

A vizsgált baktériumokat peptonvízbe oltjuk, és a kémcsöveket inkubátorba helyezzük 37 °C-ra 2-7 napig. Az inkubálást követően a kémcsövekbe 0,2 ml Kovács-reagenst pipettázunk és enyhén megrázzuk. Pozitív reakció esetén a felülúszó amilalkohol piros gyűrűt képez, negatív reakció esetén sárgás gyűrű lesz látható.

23.3. A kataláz kimutatása

Az aerob és a fakultatív anaerob baktériumok nagy része (amelyek oxigént használnak) hidrogén-peroxidot termelnek, amely mérgező a saját enzimrendszerükre nézve. A túlélés ezen antimetabolit jelenlétében azért lehetséges, mert ezek a baktériumok kataláz enzimet is képesek termelni. Az 5 ml táplevest tartalmazó kémcsövekbe átvittjük a vizsgált baktériumokat. Ezt követi az inkubálás 2-3 napig, 28 vagy 37 °C-on. Ezután a kémcsövekbe 3 ml 3%-os H_2O_2 -t adunk. Pozitív reakció esetén (kataláz enzim jelenlétében) az oxigénfelszabadítás következtében pezsgés figyelhető meg.

23.4. A kénhidrogén-képződés kimutatása ólomacetát-oldattal átitatott szűrőpapírcsíkok módszerével

Egyes baktériumok, mint például a *Proteus vulgaris*, kénhidrogént (H_2S) szabadítanak fel a kéntartalmú aminosavakból (cisztein, cisztin stb.). Ezek a mikroorganizmusok cisztein-deszulfuráz enzimet termelnek. A kénhidrogén-képződés az első lépés a cisztein dezaminálása során, és ez a reakció több módszerrel is kimutatható.

A vizsgált baktériumokat peptonvízbe oltjuk. A reagens papírcsíkot (ólomacetát-oldattal átitatott szűrőpapír) úgy helyezzük a kémcsőbe, hogy a tápleves felszínétől 1-2 cm-re legyen (de ne érjen bele, mert az ólomacetát mérgező a mikroorganizmokra), majd a dugóval rögzítsük. Az inkubálás 2-7 napig tart 37 °C-on. Pozitív reakció esetén a reagens papírcsíkon fekete elszíneződés látható a ciszteinből termelt H_2S következtében. Negatív a próba, ha elszíneződés nem figyelhető meg.

23.5. Karbamid-hidrolízis teszt

Sok baktérium képes a karbamid (urea) bontására. A karbamid hidrolízise az ureáz enzim hatására megy végbe. A vizsgált baktériumokat karbamidtartalmú Christensen-táptalaj felületére oltjuk. Az inkubálás 28 vagy 37 °C-on történik. Ha a baktérium kiváltotta a karbamid hidrolízisét, a táptalaj pirosra színeződik a fenol-vörös hatására NH_3 jelenlétében. Az NH_3 a karbamid bomlása során képződik.

23.6. Politróp táptalajok használata a baktérium diagnosztikában

A politróp táptalajokat széles körűen alkalmazzák a baktérium diagnosztikában. A TSI agar teszt általánosan használt az enterobaktériumok (bélbaktériumok) jellemzésére. A táptalaj glükózt alacsony (0,1%), szacharózt és laktózt magas (1,0%) koncentrációban tartalmaz. Beoltás után a baktériumok a glükózt kezdik bontani, emiatt a közeg pH-ja csökken, a fenolvörös indikátor színe sárgára változik. Kb. 8-10 óra inkubálás után a mikrobák elhasználják a glükózt. A laktózt vagy szacharózt hasznosítani képes fajok folytatják a savtermelést. Az említett cukrokat hasznosítani nem tudó fajok a táptalaj fehérjeit kezdik el bontani, ami az aminosav felszabadulása miatt lúgosítja a közeget. Mivel ez utóbbi folyamat csak aerob körülmények között megy végbe, csak a ferde felület színe változik vissza vörösre. Ha nem fermentatív mikroorganizmus kerül a TSI táptalajra, a táptalaj színe mindenhol vörös marad. Az erjesztés alatt néhány faj kén-hidrogént szabadít fel. Ez a gáz a táptalaj vas-szulfát-tartalmával reagálva fekete csapadékot hoz létre a kémcső alsó részén. Más mikroorganizmusok gázt termelhetnek, amit buborékok, szakadások jelenléte mutat, vagy néhány esetben a teljes táptalaj a kémcső aljától a dugó irányába mozdul.

A vizsgált baktériumok kacsnyi mennyiségét a ferde agar felületére oltjuk, majd beleszúrunk a táptalajba. A kémcsöveket inkubátorba helyezzük 37 °C-ra 16-24 óráig, majd megfigyeljük a reakciók okozta változásokat.

SZAKIRODALOM

- AL BULUSHI, Ismail Mohamed
2018 *The handbook of food microbiological analytical methods*. New York, Nova Science Publishers.
- BANU, Constantin (ed.)
2008 *Tratat de industrie alimentară*. București, Editura ASAB.
- BÉLÁDI Ilona-NÁSZ István (szerk.)
1997 *Orvosi mikrobiológia*. Budapest, Semmelweis Kiadó.
- CASTRO-IBÁÑEZ, I.-GIL, M.I.-ALLENDE, A.
2017 Ready-to-eat vegetables: Current problems and potential solutions to reduce microbial risk in the production chain, *LWT – Food Science and Technology* 85. 284–292.
- DA SILVA, Neusely et alii
2019 *Microbiological examination methods of food and water. A laboratory manual*. London, CRC Press.
- DEÁK Tibor (szerk.)
2006 *Élelmiszer-mikrobiológia*. Budapest, Mezőgazda Kiadó.
- DOYLE, Michael P.–BEUCHAT, Larry R.–MONTVILLE, Thomas J. (eds.)
1997 *Food Microbiology: fundamentals and frontiers*. Washington, ASM Press.
- FORSYTHE, Stephen J.
2020 *The Microbiology of safe food*. Wiley Blackwell.
- GRANATO, Paul A.–MORTON, Verna–MORELLO, Josephine A.
2019 *Laboratory manual and workbook in microbiology. Applications to patient care*. New York, McGraw-Hill Education.
- GYÖRGY Éva
2009 *Általános mikrobiológia*. Kolozsvár, Scientia Kiadó.
- HARRIGAN, W. F.–PARK, R. W. A.
1994 *Biztonságos élelmiszerek előállítása*. Budapest, Mezőgazda Kiadó.
- JAY, James. M.–LOESSNER, Martin J.–GOLDEN, David A.
2005 *Modern Food Microbiology*. Springer US.
- KERTAI Pál
1982 *Közegészségtan*. Budapest, Medicina Könyvkiadó.
- LUKACSOVICS Ferenc (szerk.)
1999 *Mikrobiológia laborgyakorlatok II*. Budapest, Kertészeti és Élelmiszeripari Egyetem.
2002 *Mikrobiológia gyakorlatok I*. Budapest, Kertészeti Egyetem.
- MADIGAN, Michael T.–MARTINKO John M.–Parker J.
2001 *Brock biology of microorganisms*. Pearson Education International.
- MAGYAR Ildikó

- 2010 *Borászati mikrobiológia*. Budapest, Mezőgazda Kiadó.
- MARÁZ Anna–FARKAS Csilla
2000 *Mikrobiológiai gyakorlatok*. Budapest, Agrárszakoktatási Intézet.
- McMAHON, M. A. S.–WILSON, I. G.
2001 The occurrence of enteric pathogens and *Aeromonas* species in organic vegetables. *International Journal of Food Microbiology* 70. 155–162.
- MUNTEAN, Vasile
2009 *Microbiologie generală*. Cluj-Napoca, Presa Universitară Clujeană.
- MĂNESCU, Sergiu (ed.)
1989 *Microbiologie sanitară*. București, Editura Medicală.
- OGAKI, M.–STĂNESCU, R. (ed.)
2003 *Controlul calității mediului*. București, Cartea Universitară.
- OPREAN, L.–MIRONESCU, M.
2000 *Microbiologie – Lucrări practice*. Sibiu, Editura Universității „Lucian Blaga”.
- PESTI Miklós (szerk.)
2001 *Általános mikrobiológia*. Budapest, Dialóg Campus Kiadó.
- RAY, Bibek–BHUNIA, Arun
2014 *Fundamental food microbiology*. Boca Raton, CRC Press.
- RHEA, Fernandes (ed.)
2009 *Microbiology Handbook. Dairy Products*. Cambridge, Royal Society of Chemistry.
- ROZGONYI Ferenc (szerk.)
2006 *Klinikai, járóbeteg-szakorvosi és háziorvosi mikrobiológiai gyorsdiagnostica, I. kötet Bacterialis fertőzések diagnosticája*. Budapest, HOM-IR.
- SHEN, Cangliang–ZHANG, Yifan
2017 *Food Microbiology Laboratory for the Food Science Student. A Practical Approach*. Cham, Springer International Publishing.
- SMID, E. J.–GORRIS, L. G. M.
1999 *Natural antimicrobials for food preservation. Handbook of Food Preservation*. New York, Marcel Dekker.
- SCHOLZ, Wolfgang
2011 *Házi sajtkészítés juh-, kecske- és tehéntejből*. Budapest, Mezőgazda Kiadó.
- SPERBER, William H.–DOYLE, Michael P. (eds.)
2009 *Compendium of the microbiological spoilage of foods and beverages*. New York, Springer-Verlag.
- TÓTH, Erika et alii
2018 *Klasszikus és molekuláris mikrobiológiai laboratóriumi gyakorlatok*. Elektronikus jegyzet. ELTE, Budapest.
- TOURNAS, V.H.

2005 Moulds and yeast in fresh and minimally processed vegetables and sprouts. *International Journal of Food Microbiology* 99. 1. 71–77.

VALERIO, F. et alii

2012 Diversity of spore-forming bacteria and identification of *Bacillus amyloliquefaciens* as a species frequently associated with the ropy spoilage of bread, *International Journal of Food Microbiology* 156. 3. 278–285.

REZUMAT

Lucrări practice de microbiologie alimentară

Îndrumarul de laborator de microbiologie alimentară în introducere conține reglementările de protecția muncii care trebuie respectate în laboratorul de microbiologie, și normele care trebuie aplicate în cursul prelevării și pregătirii probelor care sunt necesare pentru eficacitatea testării microbiologice a alimentelor. Aceasta este urmată de lucrarea practică care se ocupă cu detectarea microorganismelor din mediul înconjurător, a cărei importanță se manifestă în faptul că atrage atenția asupra necesității precauției în cursul lucrării în laborator, cât și în cazul producției alimentelor. Îndrumarul conține lucrările practice care permit examinarea proprietăților microorganismelor (bacterii, drojdii, mucegaiuri) importante din punctul de vedere a alimentelor prin tehnici microscopice, detectarea lor prin metode culturale, precum și metodele de determinare a numărului de celule vii. În legătură cu diverși factori care influențează viața microorganismelor pot fi amintite lucrările practice care prezintă efectul temperaturii, activității apei, a antibioticelor și a diferitelor substanțe de origine vegetală. Partea cu importanță majoră a îndrumarului îl reprezintă descrierea metodelor de determinare a calității microbiologice a diferitelor alimente: legume și fructe proaspete, lapte și produse lactate, produse de panificație, carne și produse din carne, conserve și a apei potabile. Ultimul capitol conține testele de confirmare biochimice utilizate în scopul identificării bacteriilor izolate din alimente.

ABSTRACT

Laboratory manual of food microbiology

The introduction of the Laboratory manual of food microbiology contains the microbiology laboratory safety rules and procedures and the requirements on sampling and sample preparation needed for an effective microbiological food analysis. This is followed by a laboratory exercise which deals with the detection of microorganisms present in the environment, the importance of which is manifested in drawing attention to precaution both in laboratory work and in food production. The laboratory manual contains laboratory practices that allow the examination of the properties of microorganisms (bacteria, yeasts, moulds) that are important regarding food with microscopic techniques, their detection by culture methods, and methods for the determination of viable cell counts. In connection with various factors that influence the life of microorganisms, we can mention the laboratory exercises that show the effect of temperature, water activity, antibiotics, and various plant origin substances. The most important part of the laboratory manual is the description of the methods for determining the microbiological quality of different foods: fresh vegetables and fruits, milk and dairy products, bakery products, meat and meat products, canned food and drinking water. The final chapter contains the biochemical confirmatory tests used to identify bacteria isolated from food.

A SZERZŐRŐL

György Éva biológus, egyetemi tanulmányait a kolozsvári Babeş–Bolyai Tudományegyetem Biológia Karán végezte, 2006-ban védte meg doktori dolgozatát. 2003-tól a Sapientia Erdélyi Magyar Tudományegyetem Csíkszeredai Karának oktatója, egyetemi docens, az Élelmiszer-tudományi Tanszék vezetője. Kutatási területei a mikrobiológia, a biotechnológia és a növénytan.

This image shows a full page of dot grid paper. The dots are arranged in a precise, repeating pattern across the entire surface, providing a guide for writing or drawing without solid lines.

Scientia Kiadó

400112 Kolozsvár (Cluj-Napoca)

Mátyás király (Matei Corvin) u. 4. sz.

Tel./fax: +40-364-401454

E-mail: scientia@kpi.sapientia.ro

www.scientiakiado.ro

Korrektúra:

Szenkovics Enikő

Műszaki szerkesztés:

Metaforma Kft.

Tipográfia:

Könczey Elemér

Nyomdai munkálatok:

F&F INTERNATIONAL Kft.

Felelős vezető: Ambrus Enikő igazgató

Az Élelmiszer-mikrobiológia laboratóriumi gyakorlatok egyetemi jegyzet az élelmiszerek szempontjából hasznos, valamint a romlást és megbetegedést okozó mikroorganizmusok kimutatásának és vizsgálatának főbb módszereit mutatja be. Tárgyalja a témakör elméleti hátterét, a gyakorlati munka részleteit, valamint az eredmények kiértékelésének eljárásait. Célja az élelmiszer-mikrobiológiai ismeretek bővítése és elmélyítése, valamint a mikrobiológia laboratóriumi munkával kapcsolatos gyakorlati készségek fejlesztése.

ISBN 978-606-975-038-4



9 | 786069 | 750384